

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS



**ESTUDIO DEL PAPEL DE LA PROTEÍNA
TAU EN LA MODULACIÓN DE LA
NEUROGÉNESIS
HIPOCAMPAL ADULTA**

TESIS DOCTORAL

Noemí Pallas Bazarra
Madrid, 2015

Memoria de investigación presentada por Noemí Pallas Bazarra para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio dirigido por el Dr. Jesús Ávila de Grado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM).

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	11
1. Neurogénesis adulta	13
1.1. Marco general e historia	13
1.2. Filogenia de la neurogénesis adulta.....	14
1.3. Regiones neurogénicas.....	15
1.4. Técnicas de estudio de la neurogénesis adulta	16
1.4.1. Metodología para la identificación de células proliferativas.....	16
1.4.2. Metodología para la identificación del fenotipo de las células identificadas como nuevas.....	18
1.4.3. Metodología para la cuantificación de la neurogénesis adulta.....	18
1.5. Neurogénesis hipocampal adulta.....	19
1.5.1. Anatomía y conexiones del hipocampo	19
1.5.2. Etapas y tipos celulares durante la neurogénesis hipocampal adulta.....	23
1.5.3. Funciones de la neurogénesis hipocampal adulta	26
1.5.4. Regulación de la neurogénesis hipocampal adulta.....	27
1.5.5. Trastornos neurodegenerativos con alteraciones de la neurogénesis hipocampal adulta: implicación en tauopatías	30
2. Proteína Tau	32
2.1. Estructura e isoformas de la proteína Tau.....	32
2.2. Distribución de la proteína Tau en el cerebro	35
2.3. Funciones fisiológicas de la proteína Tau.....	36
2.3.1. Establecimiento de la polaridad neuronal y migración.....	36
2.3.2. Regulación del transporte axonal	37
2.3.3. Tráfico intracelular de proteínas	37
2.3.4. Proteína Tau y neurogénesis adulta	37
2.4. Modelos animales para el estudio de la función de Tau	38
2.5. Neuroprotección por ausencia de Tau en condiciones patológicas.....	39
OBJETIVOS	41

1. Materiales	47
1.1. Anticuerpos.....	47
1.2. Animales.....	47
2. Métodos	49
2.1. Diseño experimental	49
2.2. Marcaje de nuevas neuronas <i>in vivo</i> con análogos de timidina.....	50
2.3. Marcaje de nuevas neuronas <i>in vivo</i> con retrovirus.....	52
2.3.1. Producción de los retrovirus	52
2.3.2. Inyección estereotáxica de retrovirus	52
2.4. Enriquecimiento ambiental.....	53
2.5. Pruebas de comportamiento.....	54
2.5.1. Test de discriminación de patrones (<i>Novel Location Preference Test</i>)....	54
2.5.2. Test del laberinto en cruz elevado (<i>Elevated Plus Maze test</i>).....	54
2.5.3. Test de natación forzada (<i>Porsolt test</i>).....	55
2.6. Sacrificio de los animales	55
2.7. Procesamiento del tejido.....	57
2.8. Técnicas histológicas.....	57
2.8.1. Inmunofluorescencia de tejido	57
2.8.2. Medición del volumen del DG y del área de la SGL.....	58
2.8.3. Cuantificación de células	59
2.8.4. Análisis de la señalización aferente en la capa molecular del DG	59
2.8.5. Cuantificación de parámetros morfométricos.....	60
2.8.6. Microscopía electrónica.....	61
2.9. Técnicas bioquímicas	62
2.9.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	62
2.9.2. PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	63
2.9.3. Preparación de extractos proteicos	64
2.9.4. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (<i>Western Blot</i>)	64
2.10. Análisis estadístico	65

1. Caracterización de la neurogénesis hipocampal adulta en condiciones basales en un modelo murino deficiente en la proteína Tau (ratones Tau-/-)..... 69

1.1. Comprobación de la ausencia de proteína Tau en el modelo	69
1.2. La ausencia de Tau no provoca alteraciones en la proliferación, muerte ni supervivencia de las nuevas neuronas generadas en el DG	72
1.3. La ausencia de Tau no provoca alteraciones en la diferenciación de las nuevas neuronas generadas en el DG	74
1.4. La ausencia de Tau produce alteraciones en la maduración morfológica de las nuevas neuronas generadas en el DG	76
1.4.1. Las nuevas neuronas producidas en el DG de los ratones Tau-/- presentan retraso en la dendritogénesis	76
1.4.2. La ausencia de Tau provoca alteraciones en el número y en el tamaño de las PSDs de las nuevas neuronas generadas en el DG	78
1.4.3. La ausencia de Tau no afecta a la morfología de los axones de las nuevas neuronas generadas en el DG	81
1.5. La neurotransmisión aferente en la capa molecular del giro dentado presenta alteraciones en los animales Tau-/-	82
1.6. La ausencia de Tau en ratones jóvenes provoca alteraciones comportamentales de tipo emocional	85

2. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre la neurogénesis hipocampal adulta en un modelo murino deficiente en la proteína Tau..... 87

2.1. En ausencia de Tau el aumento en la supervivencia de las nuevas neuronas y el descenso en la muerte celular provocados por el EA son menores	89
2.2. En ausencia de Tau no se producen los efectos estimuladores del EA sobre la morfología y las PSDs de las nuevas neuronas	91
2.2.1. En ausencia de Tau no se produce el aumento en la longitud y en la ramificación dendrítica que tiene lugar en las nuevas neuronas de los animales WT en condiciones de EA	91
2.2.2. El efecto del EA sobre las PSDs de las nuevas neuronas es diferente en animales WT y Tau-/-	93
2.2.3. En ausencia de Tau no se produce el incremento en el tamaño de los terminales axónicos de las nuevas neuronas que tiene lugar en los ratones WT sometidos a EA	95

2.3. En ausencia de Tau no se produce el aumento en la señalización GABAérgica que tiene lugar en los animales WT sometidos a EA	96
3. Efecto del estrés agudo sobre la neurogénesis hipocampal adulta en un modelo murino deficiente en la proteína Tau	98
3.1. La ausencia de Tau atenúa la reducción en la supervivencia de las nuevas neuronas producida por el estrés agudo en animales WT.....	99
3.2. La ausencia de Tau contrarresta parcialmente los efectos negativos del estrés agudo sobre la morfología y las PSDs de las nuevas neuronas	101
3.2.1. La ausencia de Tau previene las alteraciones morfológicas producidas por el estrés agudo en las nuevas neuronas.....	101
3.2.2. La ausencia de Tau reduce los efectos del estrés agudo sobre las PSDs de las nuevas neuronas.....	104
3.2.3. La ausencia de Tau previene las alteraciones en los terminales axónicos de las nuevas neuronas producidos por el estrés agudo	109
DISCUSIÓN	111
1. La proteína Tau no influye en la tasa de neurogénesis hipocampal adulta en condiciones basales, pero está implicada en la maduración de las nuevas neuronas	114
2. La proteína Tau está implicada en la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta en respuesta al enriquecimiento ambiental.....	121
3. La proteína Tau está implicada en la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta en condiciones de estrés agudo	125
4. Implicación de la proteína Tau en la modulación de la neurogénesis hipocampal adulta: una visión general.....	129
CONCLUSIONES.....	131
BIBLIOGRAFÍA	135
ANEXO	153

ABREVIATURAS

AD: *Alzheimer's Disease*/ Enfermedad de Alzheimer

AMPA: *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*

APP: *Amyloid Precursor Protein*/ Proteína precursora amiloidea

BDNF: *Brain Derived Neurotrophic Factor*/ Factor de crecimiento neurotrófico derivado del cerebro

BLBP: *Brain Lipid Binding Protein*/ Proteína cerebral de unión a ácidos grasos

BrdU: 5-bromo-2'-deoxiuridina

BSA: *Bovine Serum Albumin*/ Albúmina de suero bovina

CA: *Cornu Ammonis*/ Asta de Ammon

cDNA: *Complementary DNA*/ DNA complementario

CldU: 5-cloro-2'-deoxiuridina

Ct: Carboxilo terminal

DAPI: 4'-6-diamidino-2-fenilindol

DCX: *Doublecortin*

DG: *Dentate Gyrus*/Giro dentado

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* /Medio de cultivo Eagle, modificado por Dulbecco

DNA: *Deoxyribonucleic acid*/ Ácido desoxirribonucleico

EA: Enriquecimiento Ambiental

EC: Estabulación Control

ECL: *Enhanced Chemiluminescence Detection System*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*/ Ácido etilendiaminotetraacético

EGF: *Epidermal Growth Factor*/ Factor de crecimiento epidérmico

EML: *External Molecular Layer*/ Capa molecular externa

EPM: *Elevated Plus Maze*/ Laberinto en cruz elevado

FGF2: *Fibroblast Growth Factor 2*/ Factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2

GABA: *Gamma-aminobutyric acid*/ Ácido gamma aminobutírico

GAD-65: *Glutamate Descarboxylase 65*/ Glutamato descarboxilasa 65

GAPDH: *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*/Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

GDNF: *Glial cell Derived Neurotrophic Factor*/ Factor neurotrófico derivado de células gliales

GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein*/ Proteína ácida fibrilar glial

- GFP:** *Green Fluorescent Protein*/ Proteína fluorescente verde
- GLUR1:** *Glutamate Receptor 1*/ Receptor de glutamato 1
- GSK-3 β :** *Glycogen Synthase Kinase 3 β* / Glucógeno sintasa kinasa 3 β
- HRP:** *Horseradish Peroxidase*/ Peroxidasa de rábano
- IdU:** 5-iodo-2'-deoxiuridina
- IF:** Inmunofluorescencia
- IGF1:** *Insulin-Like Growth Factor 1*/ Factor de crecimiento insulínico tipo 1
- IML:** *Internal Molecular Layer*/ Capa molecular interna
- LTD:** *Long Term Depression*/ Depresión a largo plazo
- LTP:** *Long Term Potentiation*/ Potenciación a largo plazo
- MAP:** *Microtubule-Associated Protein*/ Proteína asociada a microtúbulos
- MML:** *Medial Molecular Layer*/ Capa molecular media
- MWM:** *Morris Water Maze*/ Laberinto acuático de Morris
- NEO:** neomicina
- NeuN:** *Neuronal Nuclei*
- NeuroD:** *Neurogenic Differentiation*
- NGF:** *Nerve Growth Factor*/ Factor de crecimiento nervioso
- NMDA:** *N-methyl-D-aspartate*
- NP:** Animales no sometidos al test de Porsolt
- NR2B:** *NMDA Receptor2B*/Subunidad 2B del receptor de glutamato de glutamato tipo NMDA
- Nt:** Amino terminal
- NT-3:** *Neurotrophin-3*/ Neurotrofina 3
- OB:** *Olfactory Bulb*/ Bulbo olfatorio
- P:** Animales sometidos al test de Porsolt
- PB:** *Phosphate Buffer*/ Tampón fosfato
- PBS:** *Phosphate Buffered saline*/ Tampón fosfato salino
- PCNA:** *Proliferating Cell Nuclear Antigen*/ Antígeno celular de proliferación nuclear
- PCR:** *Polymerase Chain Reaction*/ Reacción en cadena de la polimerasa
- PFA:** *Paraformaldehyde*/ Paraformaldehído
- PH3:** *Phosphorilated Histone 3*/ Histona 3 fosforilada

PP2A: *Protein Phosphatase 2A*/ Proteína fosfatasa 2A

Prox1: *Prospero homeobox homolog protein*/ Homólogo del gen *prospero* de *D. melanogaster*

PSDs: *Postsynaptic Densities*/ Densidades postsinápticas

PSD95: *Postsynaptic Density Protein 95*/ Proteína de densidades postsinápticas 95

PSA-NCAM: *Polysialylated form of neural cell adhesion molecule*

qRT-PCR: *quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*/ PCR cuantitativa

RNA: *Ribonucleic acid*/ Ácido ribonucleico

S.E.M.: *Standard Error of the Mean*/ Error estándar de la media

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*/ Dodecil sulfato sódico

SGL: *Subgranular Layer*/ Capa subgranular

SNAP25: *Synaptosomal-associated protein 25*/ Proteína asociada a sinaptosomas 25

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

Sox2: *Sex determining region Y-box 2*/ Región determinante del sexo Y-2

SVZ: *Subventricular Zone*/ Zona subventricular

Tau3R: isoforma de Tau con 3 repeticiones en el dominio de unión a microtúbulos

Tau4R: isoforma de Tau con 4 repeticiones en el dominio de unión a microtúbulos

Tris: tris(hidroximetil)aminometano

TUC4 (TOAD-64): *Turned On After Division, 64kDa*

VAMP2: *Vesicle-Associated Membrane Protein 2*/ Proteína asociada a membranas vesiculares 2

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*/ Factor de crecimiento vascular endotelial

vGLUT-1: *vesicular Glutamate Transporter 1*/ Transportador vesicular de glutamato tipo 1

WB: *Western Blot*

WT: *Wild Type*/ Tipo silvestre

ZnT3: Zinc Transporter 3/ Proteína transportadora de zinc 3

SUMMARY

Alterations in tau protein metabolism are found in a subset of neurodegenerative disorders known as tauopathies, the most common of which is Alzheimer's disease. As several tauopathies are accompanied by memory deficits, and adult hippocampal neurogenesis is crucial for learning and memory, tau protein might be involved in this process. In fact, Tau isoforms with three microtubule-binding domains (Tau3R) and high phosphorylation levels are found in neurons during embryonic development and also in murine adult newborn neurons, but not in mature neurons in the adult brain. Therefore, the aim of this work was to study the role of Tau protein on adult hippocampal neurogenesis. Besides, since adult neurogenesis is regulated by different environmental factors, we were aimed to investigate the role of Tau in the regulation of adult neurogenesis that either pro- or anti- neurogenic stimuli exert.

We have studied Tau knockout mice (Dawson *et al.*, 2001) to analyze the generation and maturation of newborn neurons in the dentate gyrus. We have used three different approaches to study the effect of lacking tau protein on this region: thymidine analogs (in order to study cell survival at different time points), PSD95-GFP retrovirus infection (to analyze the morphology and connectivity of newborn neurons), and specific markers (to analyze the different stages of newborn cells maturation). These methodologies were combined with the use of several behavioral tests aimed to analyze the effect of lacking tau protein on hippocampal-dependent memory (Novel Object Location Preference test) and mood-related behaviors (Elevated Plus Maze and Porsolt tests). As a pro-neurogenic stimulus we have used environmental enrichment, and as an anti-neurogenic stimulus we have used the acute stressor induced by the Porsolt test.

The results showed, first, that lacking Tau protein has no effects on adult hippocampal neurogenesis rate under basal conditions. However, it impairs dendritic development and results in postsynaptic density (PSD) alterations. Nevertheless, these alterations are not accompanied by impairments of behavioral pattern separation tasks nor by the appearance of depression-like behavior, although an increase in anxiety-like behavior was detected in these mice.

On the other hand, lacking Tau protein weakened the pro-neurogenic effects of environmental enrichment on adult hippocampal neurogenesis. It resulted in an attenuated increase in adult neurogenesis rate. Besides, nor dendritogenesis nor synaptic adaptations to the higher activity demand took place on mature newborn neurons in absence of Tau as they did in the wild type mice.

Finally, lacking Tau protein exerted neuroprotective effects on adult hippocampal neurogenesis after acute stress. It partially protected immature newborn neurons against Porsolt test induced cell death. Moreover, after newborn neurons completed their maturation, the lack of Tau protein was still neuroprotective with regard to stress induced damage in their dendrites and synaptic connections.

Summarizing, lack of Tau protein does not seem to produce marked alterations in the basal rate of adult hippocampal neurogenesis, although Tau seems to be involved in newborn neuron maturation. In addition, it plays a crucial role in the modulation of adult hippocampal neurogenesis exerted by either positive or negative stimuli.

INTRODUCCIÓN

1. Neurogénesis adulta

1.1. Marco general e historia

La neurogénesis, o proceso de generación de nuevas neuronas, es un concepto relacionado de forma clásica con la formación del sistema nervioso durante el desarrollo embrionario. De hecho, a principios del Siglo XX Santiago Ramón y Cajal afirmaba que “una vez que el desarrollo ha finalizado, las fuentes de regeneración de los axones se secan definitivamente. En los centros adultos, las vías nerviosas están fijadas y son inmutables: todo puede morir; nada puede ser regenerado”. Hoy en día, sin embargo, gracias a los avances tecnológicos experimentados desde que Cajal postulara su teoría, sabemos que, aunque la formación de neuronas ocurre mayoritariamente durante el desarrollo, existe también neurogénesis en el cerebro adulto.

Históricamente, el estudio de la neurogénesis adulta empezó a ganar interés científico en la década de 1990, pero la primera demostración de su existencia se atribuye a Joseph Altman en 1962 (Altman, 1962). Los trabajos de Altman fueron recibidos con escepticismo en su momento por parte de la comunidad científica, y durante los años siguientes fueron pocos los que continuaron haciendo aportaciones al campo. Cabe destacar en esta época trabajos como los de Kaplan (Kaplan y Hinds, 1977), que demostró mediante microscopía electrónica que las células que se estaban generando eran neuronas, o los de Nottebohm en aves cantoras (Goldman y Nottebohm, 1983; Paton y Nottebohm, 1984), que se podrían considerar la primera evidencia de funcionalidad desempeñada por estas nuevas neuronas.

No fue hasta la década de 1990, la denominada “Década del Cerebro” (Blakeslee, 2000), cuando el estudio de la neurogénesis adulta volvió a ser un tema científico de interés creciente. A esto contribuyeron trabajos como los de Elizabeth Gould, Heather Cameron y colaboradores, que en conjunción con el laboratorio del Profesor Bruce McEwen publicaron varios estudios que combinaban los métodos autorradiográficos clásicos del momento con los métodos inmunohistoquímicos que comenzaron a aplicarse extensivamente a partir de entonces (Gould *et al.*, 1992; Cameron *et al.*, 1993b; Gould *et al.*, 1994). Estos trabajos supusieron lo que se considera cronológicamente como la última demostración definitiva de la existencia de neurogénesis adulta. Un poco más adelante, en 1998, el estudio de Peter Eriksson que demostraba la existencia de neurogénesis adulta en humanos (Eriksson *et al.*, 1998) terminó de proyectar este campo de investigación a la cabeza de la experimentación en neurociencia.

Hoy en día, 20 años después de esa década de resurgimiento, la neurogénesis adulta se encuentra ya ampliamente aceptada y continúa siendo objeto de infinidad de estudios relacionados tanto con su función fisiológica, como con su relación con diversas patologías del sistema nervioso.

1.2. Filogenia de la neurogénesis adulta

La neurogénesis adulta es un proceso que se ha observado en numerosas especies alejadas en la escala filogenética. Como norma general puede decirse que en los organismos con sistemas nerviosos más primarios se observa una tendencia mayor a la permanencia de la neurogénesis a lo largo de toda la vida que en organismos que poseen sistemas nerviosos más complejos.

En animales no mamíferos se ha descrito la existencia de neurogénesis adulta en insectos como la mosca *Drosophila melanogaster*, que renueva las neuronas de sus cuerpos setíferos (*mushroom bodies*) (Cayre *et al.*, 2000); en peces gymnotiformes alrededor de los ventrículos (Zupanc y Horschke, 1995), en el bulbo olfatorio del pez cebra (Byrd y Brunjes, 2001) y en la retina del pez dorado (Wu *et al.*, 2001); en anfibios y reptiles, que muestran una elevada capacidad regenerativa general en su cerebro (Lopez-Garcia *et al.*, 1988); y en el núcleo cerebral encargado del canto en pájaros cantores, dónde la regeneración neuronal es imprescindible para el aprendizaje de nuevos cantos en cada estación de cría (Goldman y Nottebohm, 1983; Paton y Nottebohm, 1984).

En mamíferos no primates se ha descrito neurogénesis adulta en ratones, rata, cobaya, perrillo de las praderas y conejo, y en primates se sabe que existe desde el año 1981 (Rakic y Nowakowski, 1981). En humanos se atribuye el descubrimiento de la existencia de neurogénesis adulta a Eriksson y colaboradores en el año 1998 (Eriksson *et al.*, 1998). Estudios posteriores *ex vivo* han podido corroborar que el cerebro humano contiene células madre en la edad adulta capaces de dar lugar a neuronas (Kirschenbaum *et al.*, 1994) y de originar neuroesferas primarias y secundarias *in vitro* (Kukekov *et al.*, 1999). Un poco más tarde, en el año 2002, se demostró que neuronas diferenciadas *in vitro* a partir de precursores aislados del hipocampo humano adulto son capaces de integrarse en circuitos preexistentes y ser sináptica y eléctricamente funcionales (Song *et al.*, 2002). Más recientemente, gracias a las nuevas técnicas basadas en la cantidad de carbono-14 en el DNA de las células, que permiten establecer su edad aproximada, se ha podido demostrar que la neurogénesis adulta en el hipocampo humano es mucho mayor cuantitativamente que en otras especies como los roedores (cerca del 100% de renovación neuronal en humanos en comparación con aproximadamente un 10% en roedores) (Spalding *et*

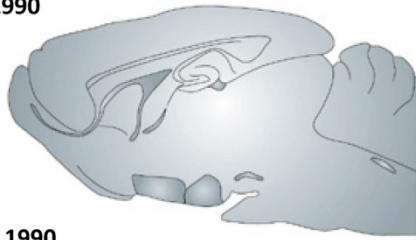
al., 2013). La contribución funcional de estas nuevas neuronas, sin embargo, todavía no se ha podido estudiar a fondo en humanos. En este sentido, las nuevas técnicas de neuroimagen suponen una herramienta muy prometedora (Ho et al., 2013).

1.3. Regiones neurogénicas

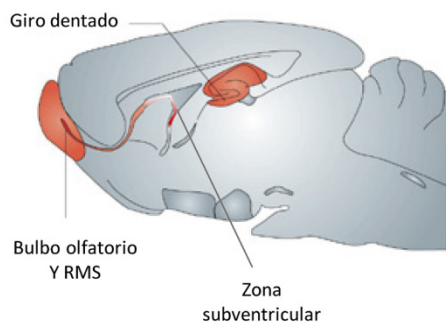
Las zonas neurogénicas del cerebro se definen no tanto por la presencia de precursores neuronales en sí, que existen también en algunas zonas no neurogénicas, sino por la presencia de una matriz germinativa de características especiales que mantiene una producción significativa de nuevas neuronas a lo largo de toda la vida. A este respecto es importante resaltar el concepto de “permisividad neurogénica” (revisado en (Kempermann, 2006)). Para que una zona pueda considerarse como verdaderamente neurogénica debe cumplirse el hecho de que cuando una célula precursora se trasplanta a ella debe dar lugar a una neurona, mientras que si esa misma célula precursora fuese trasplantada a una zona no neurogénica, debería originar una célula glial o morir. Dicha permisividad se consigue gracias a la presencia de un microambiente particular que promueve el desarrollo neuronal de los precursores. En este microambiente las células se encuentran organizadas formando una unidad funcional que engloba a los precursores propiamente dichos, astrocitos, células endoteliales, microglía, macrófagos, una matriz extracelular especial y contactos con la membrana basal. Esta particular estructura es exclusiva de las regiones neurogénicas del cerebro.

En el cerebro adulto de mamíferos las regiones neurogénicas principales en condiciones fisiológicas son el conjunto formado por la zona subventricular (*subventricular zone*; SVZ) y el bulbo olfatorio (*olfactory bulb*; OB), y la capa subgranular del giro dentado del hipocampo (*subgranular layer*; SGL). Recientemente se ha descrito también la generación de nuevas neuronas en el hipotálamo, el estriado, la amígdala, la corteza piriforme y otras regiones del cerebro adulto (revisado en (Gould, 2007; Arisi et al., 2012)) (Figura 1). No obstante, la existencia de neurogénesis adulta en algunas de estas regiones es todavía controvertida, y la contribución cuantitativa y el impacto funcional de estas nuevas neuronas todavía no están muy estudiados. En condiciones patológicas, sin embargo, se ha descrito que puede darse neurogénesis adulta en zonas en principio no neurogénicas (Magavi et al., 2000). Para ello es necesaria la presencia de precursores neuronales, bien propios de la zona o bien atraídos desde otras zonas, y un cambio en el microambiente fisiológico que lo haga más permisivo para la generación de nuevas neuronas (Kempermann, 2006).

Antes de 1990



Década de 1990



En la actualidad

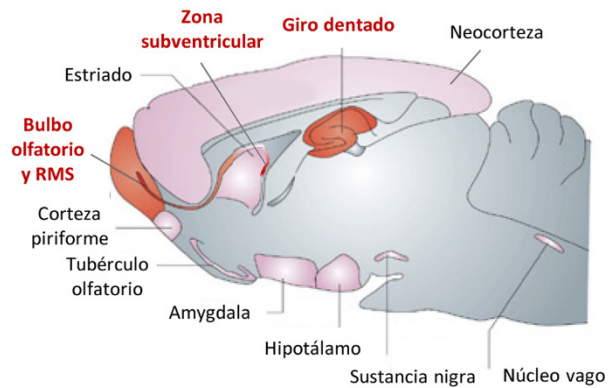


Figura 1. Representación esquemática de las regiones neurogénicas descritas en el cerebro adulto de roedores. Antes de 1990 todas las regiones del cerebro adulto eran consideradas “no neurogénicas” (regiones en gris). En la década de los 90 se aceptó la existencia de neurogénesis adulta en el giro dentado del hipocampo, así como en el bulbo olfatorio y en la zona subventricular, que envía las nuevas neuronas generadas al bulbo olfatorio a través de la corriente migratoria rostral (*rostral migratory stream*; RMS) (regiones en rojo). En la actualidad, además de las regiones neurogénicas aceptadas en los 90 (regiones en rojo), existe controversia acerca de la existencia de neurogénesis adulta en otras regiones cerebrales (regiones en rosa). Modificado de Gould, 2007.

1.4. Técnicas de estudio de la neurogénesis adulta

Una de las principales limitaciones en el estudio de la neurogénesis adulta es el escaso repertorio de técnicas disponibles y aplicables para su estudio *in vivo*. Esto da lugar a discrepancias que hacen que muchos de los datos obtenidos en este campo no sean totalmente comparables y que las conclusiones alcanzadas difieran de un estudio a otro. Por tanto, cada vez son más los autores que señalan la necesidad de una evaluación crítica de la metodología empleada como aspecto clave en la interpretación de los datos relativos a la neurogénesis adulta.

1.4.1. Metodología para la identificación de células proliferativas

Históricamente los primeros marcadores usados con este fin fueron la timidina marcada con tritio y el análogo de timidina 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU). En la actualidad, sin embargo, debido a las limitaciones de estos marcajes, se aconseja complementarlos y contrastarlos con otros métodos de identificación de nuevas neuronas como la infección con retrovirus o los marcadores intrínsecos de proliferación (Kempermann, 2006).

1.4.1.1. Timidina tritiada y análogos de timidina

El fundamento de estas técnicas se basa en que los nucleótidos marcados se incorporan al DNA (*deoxyribonucleic acid*; ácido desoxirribonucleico) de las nuevas células durante la fase S del ciclo celular, pudiendo ser detectados posteriormente por autorradiografía, en el caso de la timidina tritiada, o mediante inmunodetección con anticuerpos, en el caso de la BrdU. Dado que ambos marcadores tienen carácter permanente, puede concluirse que aquellas células marcadas se encontraban en la fase S del ciclo celular en el momento de inyección de la molécula. Cronológicamente la utilización de la timidina tritiada es anterior, pero en la actualidad se encuentra casi totalmente sustituida por la BrdU. Esto es debido a que la resolución de la BrdU se considera mayor que la de la timidina tritiada, y además es posible combinar su marcaje con el de otras moléculas que después serán diferenciadas en función del anticuerpo secundario fluorescente utilizado. Además, actualmente se encuentran disponibles en el mercado otros análogos de timidina, como la 5-yodo-2'-deoxiuridina (IdU) y la 5-cloro-2'-deoxiuridina (CldU), que son reconocidos por anticuerpos diferentes. Esto supone una gran ventaja metodológica, ya que combinándolos es posible marcar varias poblaciones celulares de edades diferentes en el mismo animal.

El principal problema de todos estos marcadores es que, además de marcar células en proliferación, también pueden incorporarse al DNA durante procesos de reparación o en las fases finales de la apoptosis, momento en el que se produce fragmentación de DNA (Rakic, 2002). Es por ello que hoy en día se aconseja complementar los resultados extraídos de estos marcajes con los de otros métodos de identificación de nuevas neuronas.

1.4.1.2. Infección con retrovirus que expresan proteínas fluorescentes

Los retrovirus se administran mediante inyección estereotáxica en la zona deseada e integran su material genético específicamente en las células en proliferación (Lewis y Emerman, 1994), pudiendo ser estas células detectadas posteriormente por la expresión de la proteína fluorescente. Esta técnica permite analizar la morfología y las propiedades electrofisiológicas de las nuevas neuronas (Carlen *et al.*, 2002; van Praag *et al.*, 2002). Además, utilizando retrovirus que codifiquen para la expresión de la proteína fluorescente acoplada a una proteína característica de alguna estructura neuronal de interés, como por ejemplo las sinapsis, es posible analizar también el estado de esta estructura en las nuevas neuronas (Kelsch *et al.*, 2008). Adicionalmente, combinando la infección con retrovirus con la técnica del trazado monosináptico de conexiones basado en el virus de la rabia (Wickersham *et al.*, 2007), es posible identificar las neuronas presinápticas que conectan con las nuevas neuronas generadas en el adulto y estudiar así las conexiones que se establecen con el circuito preexistente (Deshpande *et al.*, 2013).

1.4.1.3. Marcadores intrínsecos de proliferación

La detección inmunohistoquímica de células que expresan marcadores intrínsecos de proliferación permite la identificación de las células que se están dividiendo sin necesidad de administrar agentes externos. Sin embargo, esta técnica no permite el seguimiento de las nuevas neuronas a lo largo de su desarrollo. Entre los marcadores más comunes están el antígeno celular de proliferación nuclear (*proliferating cell nuclear antigen*; PCNA), la proteína Ki67 y la histona 3 fosforilada (*phosphorylated histone 3*; PH3) (Kempermann, 2006).

1.4.2. Metodología para la identificación del fenotipo de las células identificadas como nuevas

Una vez identificadas las células proliferativas, es necesario demostrar que tienen identidad neuronal. En general esto se hace mediante detección inmunohistoquímica de marcadores de los distintos estadios de diferenciación, pero es importante tener en cuenta que, aunque metodológicamente se asocien unos determinados marcadores con cada estadio, muchos de ellos marcan en realidad distintos tipos celulares. Es por ello que se hace necesario combinar distintos marcadores para obtener resultados fiables. Algunos de los más frecuentemente utilizados se resumen en la **Tabla 1**.

1.4.3. Metodología para la cuantificación de la neurogénesis adulta

Por cuestiones prácticas, es sencillo comprender la imposibilidad técnica del experimentador a la hora de contar todas las células presentes en un animal. Por ello, los recuentos celulares son siempre estimaciones matemáticas de dicho número total de células (Kempermann, 2006). El recuento de células en una muestra dada ha sido históricamente un recuento de perfiles celulares en el marco de un área de recuento de referencia. La estereología es una técnica de recuento no sesgada que reúne una serie de principios teóricos que pueden resultar de gran utilidad en la estimación de números totales de células (Haug, 1986). Con la aplicación de esta serie de principios teóricos pueden obtenerse números de células por estructura anatómicamente definida.

MARCADOR	ESTADIO DE DIFERENCIACIÓN	DESCRIPCIÓN	REFERENCIAS
GFAP (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)	Precursores neuronales	Proteína característica de astrocitos que además se expresa en los precursores neuronales del cerebro adulto.	(Doetsch <i>et al.</i> , 1999) (Seri <i>et al.</i> , 2001)
Nestina	Precursores neuronales	Filamento intermedio específico neuronal que se expresa en los precursores neuronales del cerebro adulto de ratón.	(Reynolds y Weiss, 1992) (Cao <i>et al.</i> , 2006)
Sox2 (<i>Sry-related HMG box 2</i>)	Precursores neuronales	Factor de transcripción esencial durante el desarrollo embrionario del SN cuya expresión se mantiene en los precursores neuronales del cerebro adulto.	(Gubbay <i>et al.</i> , 1990) (Ferri <i>et al.</i> , 2004) (Park <i>et al.</i> , 2008)
BLBP (<i>brain lipid binding protein</i>)	Precursores neuronales	Proteína de unión a ácidos grasos que se expresa en el citoplasma y núcleo de la glía radial durante el desarrollo embrionario y durante la neurogénesis adulta.	(Feng <i>et al.</i> , 1994) (Sundholm-Peters <i>et al.</i> , 2004)
DCX (<i>doublecortin</i>)	Neuroblastos (células con capacidad mitótica)	Proteína asociada a microtúbulos abundante en neuroblastos y neuronas inmaduras en migración.	(Meyer <i>et al.</i> , 2002) (Brandt <i>et al.</i> , 2003) (LoTurco, 2004)
PSA-NCAM (<i>polysialylated form of neural cell adhesion molecule</i>)	Neuroblastos (células con capacidad mitótica)	Proteína que se expresa en progenitores gliales durante el desarrollo postnatal del cerebro y en neuroblastos y neuronas inmaduras en migración durante la neurogénesis adulta.	(Ben-Hur <i>et al.</i> , 1998) (Seki, 2002)
NeuroD (<i>neurogenic differentiation</i>)	Neuroblastos (células con capacidad mitótica)	Factor de transcripción que determina la diferenciación neuronal en etapas tardías.	(Seki, 2002)
TUC4 o TOAD-64 (<i>turned on after division, 64 kDa</i>)	Neuroblastos (células con capacidad mitótica)	Proteína asociada a procesos de crecimiento axonal que se expresa en neuroblastos tardíos y en neuronas inmaduras.	(Minturn <i>et al.</i> , 1995)
β-3-tubulina	Neuroblastos (células con capacidad mitótica)	Isotipo de tubulina específico de neuronas que en neurogénesis adulta se usa como marcador temprano de nuevas neuronas.	(Doetsch <i>et al.</i> , 1997) (Gould <i>et al.</i> , 2001)
Calretinina	Neuronas (células postmitóticas)	Proteína de unión a calcio que se expresa de forma transitoria en células postmitóticas tempranas durante la neurogénesis adulta.	(Brandt <i>et al.</i> , 2003) (Kempermann <i>et al.</i> , 2004) (Ming y Song, 2005)
Calbindina	Neuronas (células postmitóticas)	Proteína de unión a calcio que sustituye a la calretinina cuando la neurona madura.	(Brandt <i>et al.</i> , 2003) (Dominguez <i>et al.</i> , 2003)
NeuN (<i>neuronal nuclei</i>)	Neuronas (células postmitóticas)	Proteína nuclear específica de células postmitóticas en todos sus estadios de diferenciación (neuronas inmaduras y maduras).	(Mullen <i>et al.</i> , 1992)
Prox1 (<i>prospero homeobox protein 1</i>)	Neuronas (células postmitóticas)	Factor de transcripción específico de neuronas granulares del DG del hipocampo.	(Kronenberg <i>et al.</i> , 2003)

Tabla 1. Marcadores utilizados para la identificación del fenotipo celular y estadio de diferenciación durante el proceso de neurogénesis adulta.

1.5. Neurogénesis hipocampal adulta

Entre las regiones neurogénicas descritas anteriormente, la más estudiada hasta la fecha es la SGL del hipocampo. Esto es así debido a que la mayoría de los estudios se realizan desde un punto de vista antropocéntrico, y numerosas enfermedades del sistema nervioso han sido relacionadas con alteraciones en el hipocampo y en la neurogénesis hipocampal adulta (revisado en (Lepousez *et al.*, 2015)). Así pues, debido a su relevancia funcional, y sobre todo a su relación con enfermedades neurodegenerativas como las tauopatías, esta tesis se centrará en el estudio de la neurogénesis hipocampal adulta.

1.5.1. Anatomía y conexiones del hipocampo

El hipocampo es una estructura bilateral que se encuentra en los lóbulos temporales de ambos hemisferios cerebrales. Su nombre deriva del término latino *hippocampus*, que significa caballito de mar, y recibe este nombre por sus similitudes morfológicas con el cuerpo de dicho animal. El hipocampo pertenece a la parte evolutivamente más antigua de la corteza cerebral, el denominado *allocortex*, y en él residen importantes funciones relacionadas principalmente con el aprendizaje y la memoria declarativa, que hace referencia a aquellos recuerdos relacionados con

sucesos autobiográficos que pueden evocarse de forma explícita. De hecho, el hipocampo se considera la “puerta de entrada a la memoria” porque en él se procesa y evalúa la información antes de ser almacenada en otras regiones neocorticales. Además, se ha demostrado que el hipocampo recibe información de otras estructuras del sistema límbico y participa en la modulación de comportamientos de tipo emocional (Kempermann, 2006). Anatómicamente el hipocampo puede subdividirse en las siguientes regiones: *fascia dentata* o giro dentado (*dentate gyrus*, DG), *cornu ammonis* o asta de Ammon (que se subdivide a su vez en las regiones CA1, CA2 y CA3), *presubiculum* y *subiculum* (Figura 2 A).

La mayor parte de las aferencias del hipocampo proceden de la corteza entorrinal, que es una zona de convergencia de información sensorial. La corteza entorrinal envía sus proyecciones al hipocampo a través de dos vías principales: el circuito trisináptico clásico y el circuito monosináptico. El circuito trisináptico clásico se origina en la capa II de la corteza entorrinal y proyecta a través de la vía perforante a las dendritas de las neuronas granulares del DG, dónde se establece la primera sinapsis. Los axones de las neuronas granulares se dirigen a las neuronas piramidales de CA3 formando el denominado tracto de fibras musgosas, estableciéndose en CA3 la segunda sinapsis. A su vez, las neuronas piramidales de CA3 se conectan a través de la denominada colateral de Schaffer con las neuronas de CA1, dónde tiene lugar la tercera sinapsis. El circuito monosináptico, por su parte, se origina en la capa III de la corteza entorrinal y proyecta directamente a las neuronas de CA1. En ambos circuitos la información vuelve desde CA1 a la corteza entorrinal pasando por el *subiculum*, y de ahí se dirige a áreas corticales asociativas. Adicionalmente, se ha descrito hace poco la existencia de un circuito trisináptico alternativo que implica la conexión entre el DG y CA2 en lugar de CA3 (Kohara *et al.*, 2014; Llorens-Martin *et al.*, 2015). Los tres circuitos se encuentran resumidos en la Figura 2 B.

Aunque estos circuitos no son independientes entre sí, parece que el circuito trisináptico clásico se encuentra relacionado con procesos generales de aprendizaje y memoria episódica (Nakazawa *et al.*, 2002; McHugh *et al.*, 2007; Nakashiba *et al.*, 2008; Nakashiba *et al.*, 2012), mientras que el circuito monosináptico se encuentra más asociado a procesos concretos de memoria asociativa (Suh *et al.*, 2011) y el circuito trisináptico alternativo a procesos de memoria social y contextual (Hitti y Siegelbaum, 2014; Wintzer *et al.*, 2014).

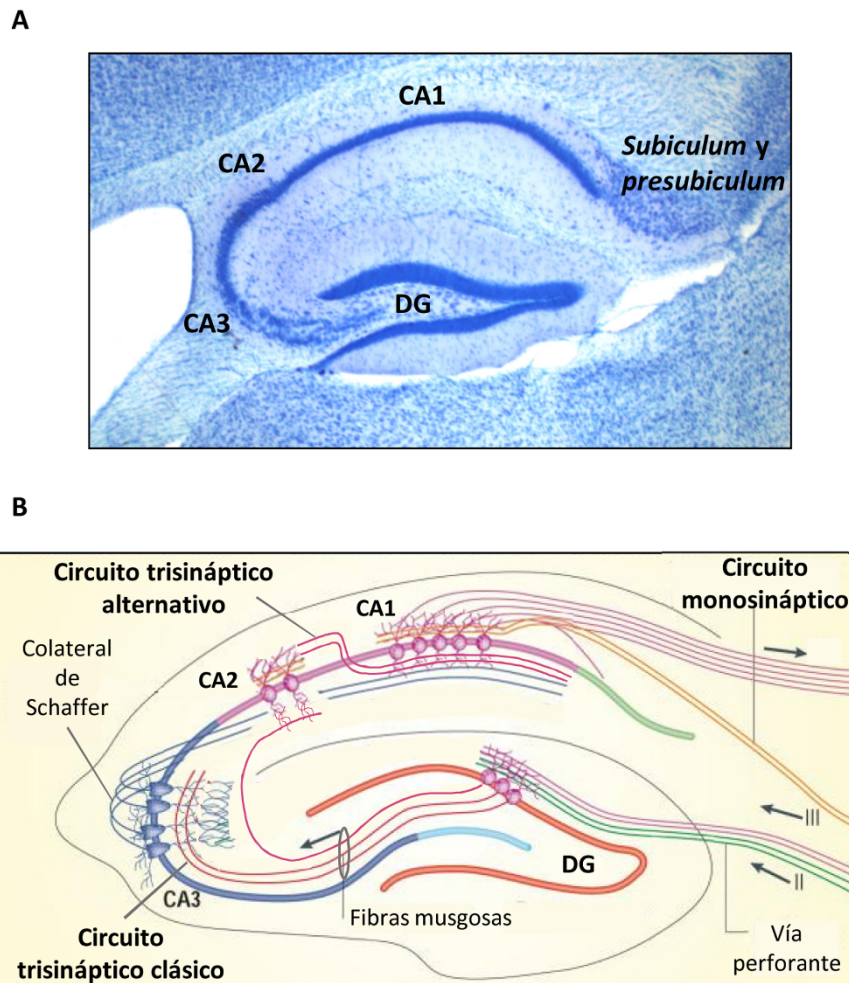


Figura 2. Anatomía y conexiones del hipocampo. (A) Tinción de Nissl del hipocampo dorsal de ratón en la que se distinguen sus diferentes regiones: giro dentado (DG), asta de Ammon (regiones CA1, CA2 y CA3), *presubiculum* y *subiculum*. (B) Representación esquemática de los principales circuitos hipocámpales. En el circuito trisináptico clásico las aferencias procedentes de la capa II de la corteza entorrinal contactan con las dendritas de las neuronas granulares del DG (1º sinapsis). Estas neuronas a su vez envían sus axones (fibras musgosas) a CA3 (2º sinapsis). Los axones de las neuronas de CA3 proyectan a CA1 a través de la colateral de Schaffer (3º sinapsis). En el circuito trisináptico alternativo los axones de las neuronas del DG conectan con CA2 en lugar de con CA3. En el circuito monosináptico las aferencias procedentes de la capa III de la corteza entorrinal contactan directamente con CA1. Desde CA1, en todos los casos, la información procesada es enviada a áreas corticales asociativas. Modificado de Deng *et al.*, 2010.

Dentro de estos circuitos, la mayor parte de las sinapsis que tienen lugar en las dendritas de las neuronas granulares del DG son glutamatérgicas (excitatorias) o GABAérgicas (sinapsis que responden al ácido gamma aminobutírico) (inhibitorias). Las sinapsis GABAérgicas tienen lugar directamente en el eje de la dendrita. En las sinapsis glutamatérgicas, sin embargo, todas las proteínas, orgánulos y componentes del citoesqueleto que forman la región postsináptica se encuentran dentro de pequeñas protrusiones membranas denominadas espinas dendríticas. En la membrana de estas espinas dendríticas, normalmente en la zona distal, es dónde se localizan las densidades postsinápticas (*postsynaptic densities*; PSDs), que son las estructuras en las que tiene lugar la transmisión de la información nerviosa en este tipo de sinapsis (Figura 3). Las PSDs

son zonas electron-densas muy complejas formadas por receptores de glutamato - principalmente tipo NMDA (*N-methyl-D-aspartate*) y tipo AMPA (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)-, proteínas de andamiaje, y multitud de moléculas implicadas en la transmisión de señales. Dentro de las proteínas de andamiaje de las PSDs, una de las más abundantes y de las más estudiadas es la proteína de densidades postsinápticas 95 (PSD95). PSD95 se localiza cerca de la membrana plasmática, y puede interaccionar tanto con canales y receptores transmembrana como con proteínas citoplasmáticas implicadas en diversas vías de señalización. Su función principal está relacionada con el anclaje de los receptores NMDA y AMPA a la membrana, lo cual la convierte en una proteína esencial en la transmisión nerviosa y en procesos de plasticidad sináptica (revisado en (Sheng y Hoogenraad, 2007)).

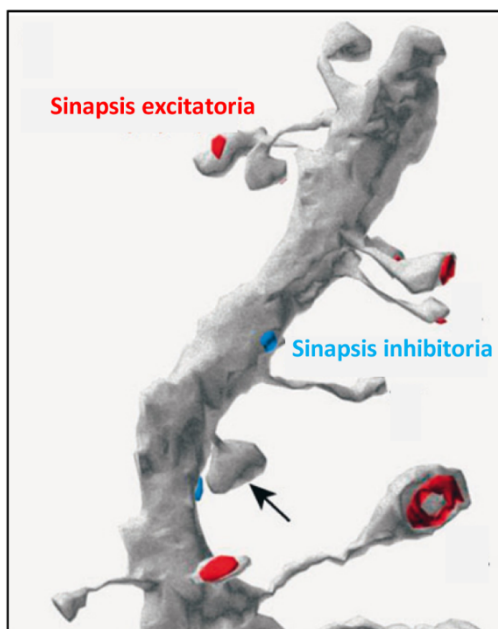


Figura 3. Sinapsis excitatorias e inhibitorias en el hipocampo. Representación tridimensional de una reconstrucción de un segmento dendrítico de una neurona hipocámpica mediante microscopía electrónica. En rojo se indican las densidades postsinápticas (PSDs) de las sinapsis excitatorias, localizadas en espinas dendríticas. Algunas PSDs no son visibles porque están situadas en la otra cara de la espina dendrítica (flecha). En azul se indican las sinapsis inhibitorias, localizadas en el eje de la dendrita. Modificado de Sheng y Hoogenraad, 2007.

La plasticidad sináptica es la capacidad de las sinapsis de modificar su estructura y composición en respuesta a estímulos externos y cambios en la actividad nerviosa, y es una de las propiedades principales de las PSDs. En líneas generales, se ha descrito que una activación muy intensa de los receptores NMDA desencadena una cascada de señalización que induce el reclutamiento de nuevos receptores AMPA en la PSD, dando lugar así a la potenciación de la sinapsis y lo que se conoce como *long term potentiation* (LTP). Por el contrario, una activación débil de los receptores NMDA mantenida en el tiempo da lugar a la internalización de los receptores AMPA en la PSD, con el consecuente debilitamiento de la sinapsis y la denominada *long term depression* (LTD). Así pues, las PSDs pueden considerarse estructuras dinámicas y heterogéneas cuya forma, tamaño y composición varía en función de la actividad que reciben,

permitiendo de esta manera la adaptación del circuito a cambios externos (Sheng y Hoogenraad, 2007).

1.5.2. Etapas y tipos celulares durante la neurogénesis hipocampal adulta

La neurogénesis hipocampal adulta tiene lugar en la SGL del DG, dónde se encuentran los precursores neuronales que darán lugar a las nuevas neuronas granulares (**Figura 4 A-B**). Desde su nacimiento en la SGL hasta su integración en la capa granular del DG como neuronas maduras, las nuevas células pasan por una serie de etapas secuenciales que han permitido establecer una nomenclatura que hace referencia a distintos estadios funcionales. La terminología más utilizada hoy en día es la propuesta por Kempermann y colaboradores (Kempermann *et al.*, 2004). En términos generales, esta clasificación atiende a criterios morfológicos y a la expresión de marcadores característicos de cada estadio (**Figura 4 C**). De manera breve, estos estadios serían:

1.5.2.1. Nacimiento y diferenciación

- Estadio 1: división de las células tipo glía radial

Las células tipo glía radial presentes en la SGL, o células tipo 1, muestran características que recuerdan a las de la glía radial presente durante el desarrollo embrionario, con una prominente prolongación apical y diversas terminaciones basales fuertemente asociadas a los vasos sanguíneos. Su soma es de forma triangular, y se caracterizan por la expresión de los marcadores nestina, GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*), BLBP (*Brain Lipid Binding Protein*) y Sox2 (*Sex determining region Y-box 2*). No expresan, sin embargo, el marcador de astrocitos maduros S100 β . En condiciones fisiológicas no son una población que muestre una elevada tasa de proliferación (Huttmann *et al.*, 2003), pero pueden, no obstante, sufrir divisiones asimétricas, un fenómeno típico de la glía radial durante el desarrollo. Las células hijas originadas tras la división asimétrica de estas células tipo glía radial constituyen la subpoblación de células de tipo 2 (Filippov *et al.*, 2003).

- Estadios 2-4: células de amplificación transitoria

En esta fase se agrupan tres estadios consecutivos de células progenitoras que se distinguen por su potencial proliferativo y su creciente diferenciación neuronal.

Las células tipo 2 mantienen la expresión de nestina, BLBP y Sox2, pero no la de GFAP. Morfológicamente tienen procesos cortos que discurren relativamente paralelos a la SGL. Al contrario que las células tipo 1, son altamente proliferativas. La forma de los núcleos es irregular,

con gránulos de cromatina intensamente condensada. Dentro de las células tipo 2 se distinguen los subgrupos 2a (correspondiente al estadio 2) y 2b (correspondiente al estadio 3) en función de la expresión del marcador DCX (*doublecortin*), que sólo tiene lugar en las células tipo 2b (Kronenberg *et al.*, 2003). Estos estadios comprenden la transición entre los elementos de tipo glía radial y los neuroblastos en vías de diferenciación, ya que en las células de tipo 2b empiezan a aparecer los primeros rasgos evidentes de pertenencia al linaje neuronal (Kempermann, 2006).

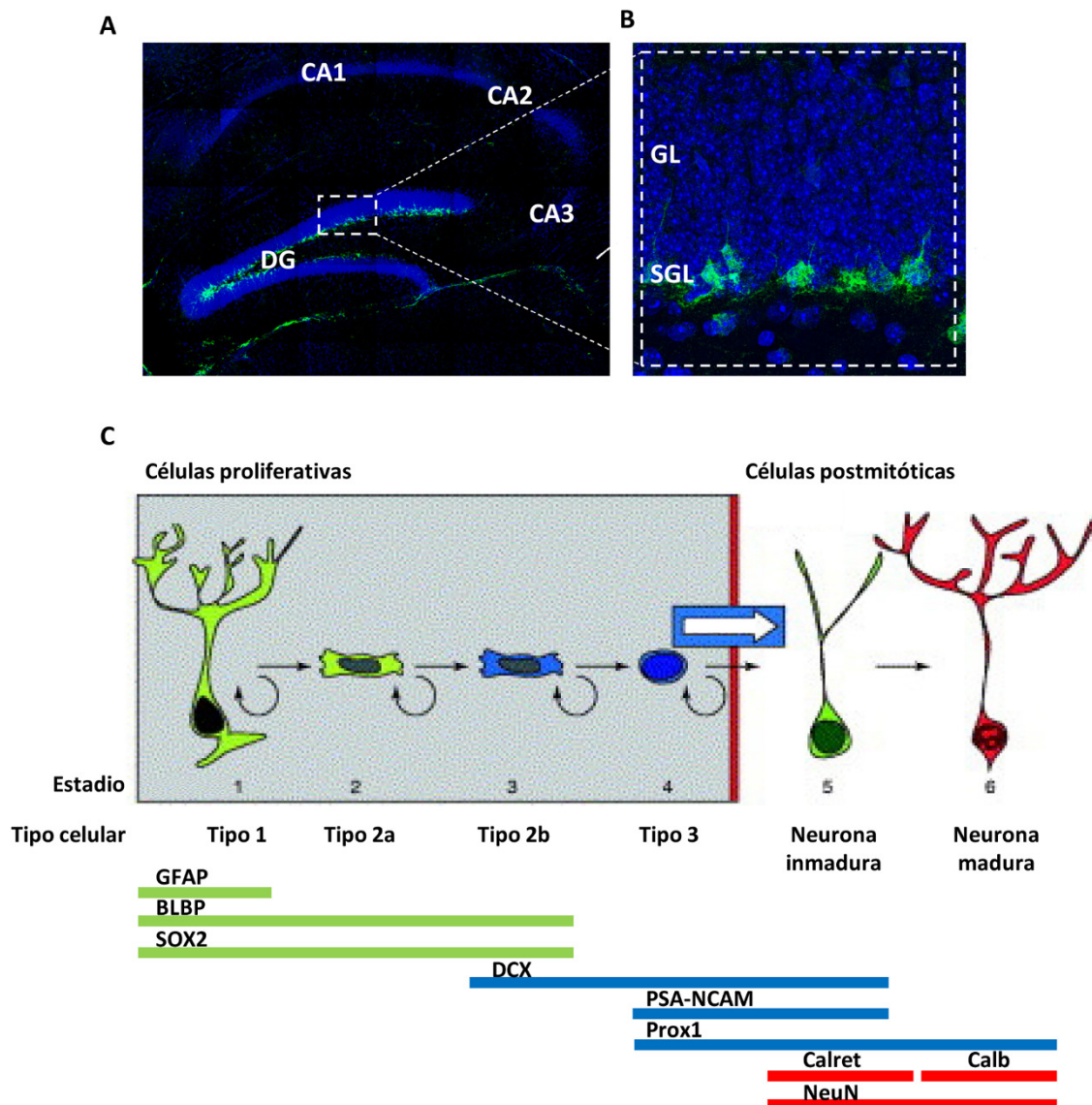


Figura 4. Etapas y tipos celulares durante la neurogénesis hipocampal adulta. (A) Imagen de inmunofluorescencia del hipocampo de ratón en la que se distinguen las regiones CA1, CA2 y CA3 y el giro dentado (DG). En verde aparecen los progenitores neuronales marcados con BLBP, y en azul aparecen los núcleos teñidos con DAPI. (B) Ampliación del DG en la que se distinguen la capa subgranular (SGL) y la capa granular (GL). En la SGL se encuentran los progenitores neuronales marcados con BLBP. (C) Representación esquemática de los distintos estadios y tipos celulares por los que pasan las nuevas neuronas durante la neurogénesis hipocampal adulta. Las barras inferiores indican las ventanas temporales de expresión aproximada de marcadores de los distintos tipos celulares. Las barras verdes corresponden a marcadores de progenitores neuronales: GFAP, BLBP, Sox2. Las barras azules corresponden a marcadores que se empiezan a expresar en los neuroblastos: DCX, PSA-NCAM, Prox1. Las barras rojas corresponden a marcadores de células postmitóticas: calretina (calret), calbindina (calb), NeuN. Modificado de Kempermann *et al.*, 2004.

Las células tipo 3 o neuroblastos, correspondientes al estadio 4, expresan el marcador DCX, pero dejan de expresar nestina, BLBP y Sox2. Aunque conservan la capacidad de dividirse, son muy pocas las que lo hacen, ya que se cree que es durante esta etapa cuando tienen lugar los cambios morfológicos más importantes del proceso diferenciativo. En estas células continúan apareciendo las prolongaciones horizontales características de los estadios 2 y 3, pero de mayor longitud, y a la vez se empiezan a originar los primeros procesos verticales. De hecho es posible encontrar células con sus prolongaciones orientadas en todas las direcciones intermedias. La morfología del núcleo es redondeada, y además de DCX es característica en este estadio la expresión de PSA-NCAM (*Polysialylated form of neural cell adhesion molecule*) y Prox1 (*Prospero homeobox homolog protein*). Durante esta etapa se produce la migración radial dentro de la capa granular, aunque en la neurogénesis hipocampal adulta la mayoría de las células permanecen en la SGL o en el tercio interno de la capa granular, alcanzando sólo algunas de ellas las zonas más externas (Kempermann *et al.*, 2003). Es también en este momento cuando las células empiezan a recibir las primeras aferencias GABAérgicas, que cronológicamente preceden a las glutamatérgicas (Ge *et al.*, 2006). Así pues, este estadio supone la transición desde un estado potencialmente proliferativo al de una neurona postmitótica inmadura.

1.5.2.2. Maduración neuronal

- Estadio 5: neuronas inmaduras

En este estadio las células son ya postmitóticas, pudiendo considerarse por tanto neuronas inmaduras. En roedores, la mayoría de las células alcanzan este estado en tan sólo 3 días, pero después tardan alrededor de 2-3 semanas en adquirir las primeras características de neuronas maduras (Kempermann *et al.*, 2004).

Las neuronas inmaduras conservan inicialmente la expresión de DCX, pero lo que define este estadio es la expresión transitoria de calretinina, que será posteriormente sustituida por calbindina (Brandt *et al.*, 2003). Otros marcadores presentes en las neuronas inmaduras son Prox1 y NeuN (*Neuronal nuclei*), pero a diferencia de la de calretinina, su expresión se mantendrá durante el resto de la vida de la neurona.

En esta fase las células adquieren la clásica morfología con orientación vertical, y el núcleo termina de adquirir la forma redondeada que caracteriza a las neuronas granulares maduras. Es en este momento cuando tiene lugar la formación de las dendritas y el axón (Hastings y Gould, 1999; Brandt *et al.*, 2003), así como el establecimiento de las primeras conexiones glutamatérgicas tanto aferentes (Esposito *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2006) como eferentes (Faulkner *et al.*, 2008; Toni *et al.*, 2008). El número de células que llega a este estadio es

muy elevado, pero durante la maduración neuronal tiene lugar un proceso de selección funcional relacionado con la actividad glutamatérgica en el que muchas de ellas son eliminadas (Toni y Sultan, 2011).

- Estadio 6: neuronas maduras

El inicio de este estadio se define por el cambio de expresión de calretinina a calbindina (Brandt *et al.*, 2003). Aunque en este momento las células tienen prácticamente todas las características de una neurona madura, no llegarán a ser funcionalmente indistinguibles de las demás neuronas granulares hasta las 8 semanas de edad aproximadamente (Toni y Sultan, 2011). Es en esta etapa cuando se produce su integración tanto en el circuito trisináptico clásico (Zhao *et al.*, 2006) como en el alternativo (Llorens-Martin *et al.*, 2015). Una característica importante de las nuevas neuronas es que durante esta última etapa de maduración muestran un menor umbral de activación y una mayor plasticidad sináptica que el resto de las neuronas granulares del DG (Schmidt-Hieber *et al.*, 2004; Ge *et al.*, 2008).

1.5.3. Funciones de la neurogénesis hipocampal adulta

La integración de las nuevas neuronas en los circuitos hipocampales preexistentes sugiere que la neurogénesis hipocampal adulta podría estar implicada en procesos de aprendizaje y memoria. Sin embargo, aunque existen evidencias de una estrecha relación recíproca entre estos procesos y la generación de nuevas neuronas (van Praag *et al.*, 2000; Shors *et al.*, 2001; Aimone *et al.*, 2006; Dupret *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008), su contribución específica todavía sigue siendo objeto de estudio.

Hoy en día se sabe que el hipocampo no es en realidad un lugar de almacenamiento de recuerdos, sino más bien una estación de procesamiento de los mismos (Kempermann, 2006). En este sentido cobra especial importancia el concepto de plasticidad sináptica, que permite la adaptación del circuito a los nuevos estímulos. La información procesada por el hipocampo no reside tanto en las neuronas individuales como en las redes sinápticas que éstas conforman, lo cual ayuda a comprender por qué la escasa contribución numérica de la neurogénesis adulta a los circuitos hipocampales da lugar a modificaciones en sus funciones. Unas pocas neuronas introducidas estratégicamente en la red pueden significar un gran incremento en la complejidad de la información procesada (Kempermann, 2002). En relación a esto es importante remarcar el hecho de que las neuronas inmaduras pasan por un periodo de hiperexcitabilidad en el que son mucho más plásticas que las neuronas maduras (Schmidt-Hieber *et al.*, 2004; Ge *et al.*, 2008), lo cual podría significar una mayor capacidad de respuesta ante estímulos nuevos. Así, se ha propuesto que las nuevas neuronas podrían ser las encargadas de codificar eventos recientes,

mientras las neuronas maduras codificarían recuerdos antiguos que posteriormente serán consolidados en otras áreas corticales (Aimone *et al.*, 2011; Kitamura y Inokuchi, 2014; Rangel *et al.*, 2014).

Por otra parte, también se ha sugerido que las neuronas inmaduras podrían tener un papel regulador sobre el circuito principal formado por las neuronas maduras. Esta hipótesis se basa en la observación de que, además de integrarse en el circuito y enviar eferencias a CA3 y CA2, las nuevas neuronas establecen sinapsis con interneuronas inhibitorias dentro del DG que conectan con las neuronas granulares maduras, de tal manera que su activación da lugar a una retroalimentación negativa del circuito (Lepousez *et al.*, 2015; Temprana *et al.*, 2015).

Esta capacidad de regulación negativa, junto con la hiperexcitabilidad que caracteriza a las neuronas inmaduras, son características cruciales en habilidades como el “*behavioral pattern separation*”, que se basa en la capacidad de formar patrones de actividad neuronal distintos para diferenciar dos contextos muy similares. En este sentido las neuronas inmaduras no sólo responden con más facilidad ante estímulos nuevos, sino que inhiben la activación de neuronas que responden ante estímulos viejos, contribuyendo así a la creación de un patrón de activación neuronal distinto (Aimone *et al.*, 2011; Lepousez *et al.*, 2015; Temprana *et al.*, 2015). Se ha demostrado que el “*behavioral pattern separation*” está estrechamente relacionado con la neurogénesis hipocampal adulta (Deng *et al.*, 2010; Aimone *et al.*, 2011; Sahay *et al.*, 2011).

Por otro lado, se ha demostrado que la generación de nuevas neuronas en el hipocampo está también relacionada con comportamientos de tipo emocional (Sahay y Hen, 2008). En este sentido, se ha observado que la neurogénesis media el efecto ansiolítico del ejercicio físico (Meshi *et al.*, 2006) y parte de los efectos de algunos fármacos antidepresivos (Santarelli *et al.*, 2003; David *et al.*, 2009).

1.5.4. Regulación de la neurogénesis hipocampal adulta

Como se ha detallado anteriormente, la neurogénesis adulta es ante todo un proceso de plasticidad neural que permite la adaptación del cerebro a las nuevas situaciones. Es por ello que puede ser modulada por múltiples factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, que actúan de manera independiente sobre la proliferación, diferenciación y supervivencia de las nuevas neuronas (Kempermann *et al.*, 1997).

1.5.4.1. Factores de modulación intrínsecos

- Edad: es el regulador negativo más fuerte de la neurogénesis adulta en todas las especies estudiadas (Altman y Das, 1965; Seki y Arai, 1995; Kuhn *et al.*, 1996; Kempermann *et al.*, 1998). Aun así, la tasa de neurogénesis adulta no desciende hasta desaparecer, pudiendo ser ésta detectada en edades avanzadas incluso en humanos, en los que además el descenso no es tan acusado como en otras especies (Eriksson *et al.*, 1998; Spalding *et al.*, 2013).

- Hormonas: las hormonas reguladoras de la neurogénesis hipocampal adulta más estudiadas, aunque no las únicas, son los corticosteroides, pudiendo actuar tanto negativa como positivamente. En general parece que unos niveles fisiológicos basales de corticosteroides son necesarios para una correcta función del hipocampo, y que sobrepasados esos niveles comienzan a producirse efectos perjudiciales que desembocan finalmente en una regulación negativa de la tasa de neurogénesis. Así, incrementos fuertes como los que pueden darse en situaciones de estrés (Tanapat *et al.*, 2001) o asociados al envejecimiento (Cameron y McKay, 1999) provocan un descenso en la neurogénesis hipocampal adulta. Sin embargo, cuando el aumento de los niveles de corticosteroides es moderado, como ocurre en diversas situaciones fisiológicas, se produce el efecto contrario (Tanapat *et al.*, 1999; Kempermann, 2006).

Además de los corticosteroides, también se han descrito efectos reguladores sobre la neurogénesis hipocampal adulta por hormonas sexuales (masculinas y femeninas) (Garcia-Segura y Wise, 2000; Saravia *et al.*, 2007; Garcia-Segura, 2008) y hormonas tiroideas (Ambrogini *et al.*, 2005; Desouza *et al.*, 2005; Montero-Pedrazuela *et al.*, 2006), entre otras.

- Neurotransmisores: una gran parte de las aferencias en el DG son glutamatérgicas y GABAérgicas. La innervación glutamatérgica tiene efectos duales sobre la neurogénesis adulta. En las neuronas inmaduras la activación de receptores de glutamato tipo NMDA determina la supervivencia celular (Ge *et al.*, 2008). En las neuronas maduras, sin embargo, parece que su sobreactivación ejerce una regulación negativa (Gould *et al.*, 1994; Cameron *et al.*, 1995; Nacher *et al.*, 2001; Okuyama *et al.*, 2004). Es más, se ha demostrado que los efectos negativos de los corticosteroides sobre la neurogénesis adulta son dependientes de la actividad de los receptores NMDA (Cameron *et al.*, 1998; Kempermann, 2006). La activación de receptores de glutamato tipo AMPA (Bai *et al.*, 2003) y tipo kainato (Parent *et al.*, 1997), sin embargo, parece tener el efecto contrario.

La innervación GABAérgica, por su parte, tiene importantes implicaciones en la diferenciación y en las propiedades electrofisiológicas de las neuronas inmaduras. Los receptores GABAérgicos se empiezan a expresar en los progenitores neuronales tipo 2b, mucho antes que los

glutamatérgicos y antes de que las células establezcan sus conexiones sinápticas. En este momento la señalización GABAérgica regula la proliferación y la diferenciación neuronal (Ge *et al.*, 2008; Toni y Sultan, 2011). Más tarde, cuando la neurona inmadura empieza a establecer sus conexiones eferentes, el GABA constituye su principal fuente de activación. Esto es así porque la señalización GABAérgica en las neuronas inmaduras es despolarizante, pasando a ser hiperpolarizante a medida que la neurona va madurando y van apareciendo los receptores glutamatérgicos. Durante este periodo de maduración se cree que el GABA y el glutamato actúan conjuntamente en la regulación de la supervivencia neuronal dependiente de actividad, aunque la contribución del GABA a este respecto todavía no ha sido comprobada (Ge *et al.*, 2008).

Además de la regulación ejercida por el glutamato y el GABA, también se ha observado una regulación positiva de la neurogénesis adulta en respuesta a acetilcolina (Cooper-Kuhn *et al.*, 2004), dopamina (Hoglinger *et al.*, 2004), noradrenalina (Kulkarni *et al.*, 2002) y serotonina (Brezun y Daszuta, 1999).

- Factores de crecimiento: son moléculas extracelulares que controlan el crecimiento celular y potencian su mantenimiento. Entre algunas de las que se ha encontrado que tienen efecto sobre la neurogénesis hipocampal adulta están el EGF (*epidermal growth factor*) (Kuhn *et al.*, 1997), el FGF2 (*fibroblast growth factor 2*) (Haik *et al.*, 2000), el IGF1 (*insulin-like growth factor 1*) (Aberg *et al.*, 2000; Lichtenwalner *et al.*, 2001; Aberg *et al.*, 2003), el VEGF (*vascular endotelial growth factor*) (Jin *et al.*, 2002) y el BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) (Pencea *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2003), entre otras. En general todos ellos ejercen su regulación estimulando la proliferación de los precursores neurales, aunque se sabe que el BDNF está implicado también en mecanismos de supervivencia celular.

1.5.4.2. Factores de modulación extrínsecos

- Ejercicio físico: el ejercicio físico es un potente inductor de la neurogénesis adulta que actúa específicamente en el hipocampo (Brown *et al.*, 2003). Aumenta la proliferación celular, la LTP y mejora la realización de tareas de aprendizaje (van Praag *et al.*, 1999a; van Praag *et al.*, 1999b; Kronenberg *et al.*, 2003).

- Enriquecimiento ambiental (EA): fue el primer modulador positivo de la neurogénesis hipocampal adulta conocido (Kempermann *et al.*, 1997). En general consiste en una combinación de estimulación cognitiva e interacción social (van Praag *et al.*, 2000), aunque muchas veces se utilizan paradigmas que incluyen también ejercicio físico. Al igual que ocurría con el ejercicio, el enriquecimiento ambiental actúa específicamente sobre la neurogénesis hipocampal (Brown *et al.*, 2003). A lo largo de los años ha demostrado mejorar la memoria y el aprendizaje

(Kempermann *et al.*, 1998; Bruel-Jungerman *et al.*, 2005), tener efectos ansiolíticos (Benaroya-Milshtein *et al.*, 2004; Galani *et al.*, 2007) y antidepresivos (Hattori *et al.*, 2007; Llorens-Martin *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009), e incrementar la supervivencia de las nuevas neuronas y la sinaptogénesis (Kempermann *et al.*, 1997; Kronenberg *et al.*, 2003; Bruel-Jungerman *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha demostrado que en función de la duración y el tiempo transcurrido después del EA estos efectos pueden variar (Leger *et al.*, 2014).

- Estrés: es uno de los reguladores negativos de la neurogénesis hipocampal adulta más importantes y estudiados, tanto en su forma crónica como aguda. Sin embargo, puesto que ejerce su efecto principalmente a través de los corticosteroides, al igual que ocurría con éstos dosis moderadas de estrés pueden tener un efecto potenciador de la neurogénesis adulta (revisado en (Kempermann, 2006)).

- Estados patológicos: se ha demostrado que distintos daños cerebrales afectan de manera diversa a la neurogénesis hipocampal adulta. Así, se han reportado por ejemplo incrementos en la proliferación celular en respuesta a ataques epilépticos (Bengzon *et al.*, 1997; Parent *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1998; Madsen *et al.*, 2000; Kron *et al.*, 2010) y a situaciones de isquemia (Liu *et al.*, 1998; Takagi *et al.*, 1999; Arvidsson *et al.*, 2002), aunque en ambos casos se detectaron alteraciones en la funcionalidad de las nuevas neuronas. La neuroinflamación, por otra parte, ha demostrado tener efectos tanto proneurogénicos como antineurogénicos en función del tipo de mediadores inflamatorios liberados y de la duración del proceso (revisado en (Fuster-Matanzo *et al.*, 2013)).

- Drogas de abuso: el consumo de determinadas sustancias como el alcohol (Nixon *et al.*, 2010), los opiáceos (Eisch *et al.*, 2000), los cannabinoides (Rueda *et al.*, 2002) o la nicotina (Abrous *et al.*, 2002), entre otras, parece regular negativamente la neurogénesis hipocampal adulta. No obstante, dada la complejidad de estos sistemas reguladores, en ocasiones se han observado indicios del efecto contrario (revisado en (Kempermann, 2006)).

1.5.5. Trastornos neurodegenerativos con alteraciones de la neurogénesis hipocampal adulta: implicación en tauopatías

El descubrimiento de la neurogénesis adulta en humanos plantea el hecho de que el sistema nervioso tenga capacidad intrínseca para repararse (Miller y Gomez-Nicola, 2014). Aunque a lo largo de los años alteraciones en la neurogénesis han sido relacionadas con enfermedades de etiología diversa, como la epilepsia (Bengzon *et al.*, 1997; Parent *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1998; Madsen *et al.*, 2000; Kron *et al.*, 2010), la esquizofrenia (Wakade *et al.*, 2002; Reif *et al.*, 2006) o la depresión (David *et al.*, 2009), esta capacidad de renovación resulta

especialmente interesante en el caso de las enfermedades neurodegenerativas, que hoy en día suponen uno de los principales problemas sanitarios del mundo desarrollado.

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida progresiva de neuronas en regiones determinadas del sistema nervioso. Se cree que esta pérdida masiva es la responsable del deterioro cognitivo y motor que experimentan los pacientes que sufren dichas enfermedades, aunque los mecanismos por los cuales ocurre no se conocen todavía en profundidad. Por ello, muchas de las aproximaciones terapéuticas se han centrado en retrasar o detener dicha muerte celular. En este sentido, el estudio de la implicación de alteraciones en la neurogénesis adulta en estas patologías supone tanto un avance en su comprensión como una potencial diana terapéutica (Winner *et al.*, 2011).

Algunas de las enfermedades neurodegenerativas más estudiadas son las tauopatías, que constituyen un grupo variado de patologías de etiología variada cuya característica común es la presencia de alteraciones en el metabolismo de la proteína Tau (Avila *et al.*, 2004; Hernandez y Avila, 2007). A pesar de ser un grupo muy heterogéneo, la mayoría de las tauopatías cursan con déficits en funciones relacionadas con el hipocampo, habiéndose encontrado en muchas de ellas alteraciones en la neurogénesis hipocampal adulta (Llorens-Martin *et al.*, 2011a; Mu y Gage, 2011; Komuro *et al.*, 2015). La más estudiada dentro de este grupo es sin duda la enfermedad de Alzheimer (*Alzheimer's disease*; AD).

La AD constituye en la actualidad la causa más común de demencia en los países desarrollados (Dartigues, 2009). Fue descrita por primera vez por Alois Alzheimer en 1907 (Alzheimer, 1907), y cursa con pérdida progresiva de memoria, afasia (pérdida del habla), apraxia (dificultad para realizar movimientos coordinados) y agnosia (pérdida de la facultad de reconocer personas o cosas) (Cummings, 2004). Existen dos tipos, uno familiar y otro esporádico, pero ambos se caracterizan histopatológicamente por la presencia aberrante de agregados intracelulares de proteína Tau hiperfosforilada (ovillos neurofibrilares) y placas extracelulares de proteína β -amiloide (placas seniles). Los mecanismos de neurodegeneración que siguen estas estructuras se desconocen, aunque hoy en día está bastante aceptado que es la proteína Tau la que media los efectos tóxicos del β -amiloide (Ittner y Gotz, 2011). Aunque se sabe que la enfermedad afecta progresivamente a diversas estructuras cerebrales, una de las más sensibles y de las primeras en sufrir neurodegeneración es el hipocampo (Ohm, 2007), habiéndose encontrado además indicios de alteraciones en la neurogénesis hipocampal adulta tanto en humanos (Jin *et al.*, 2004; Gomez-Nicola *et al.*, 2014) como en diversos modelos animales de AD (Mu y Gage, 2011). Los resultados de estos estudios pueden parecer en principio contradictorios, ya que se describieron tanto incrementos como disminuciones en el número de nuevas neuronas

(revisado en (Mu y Gage, 2011)), pero hoy en día el consenso general apunta a que la generación de neuronas maduras funcionales se encuentra disminuida. En cualquier caso, las alteraciones parecen presentarse siempre antes de que los déficits cognitivos sean patentes, lo cual hace pensar que la neurogénesis hipocampal adulta podría ser una buena diana terapéutica. En este sentido, se ha demostrado recientemente que en un modelo murino de sobreexpresión de GSK-3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*), cuyas alteraciones morfológicas en las neuronas granulares se asemejan mucho a las encontradas en pacientes humanos de AD, es posible revertir el fenotipo aberrante con enriquecimiento ambiental (Llorens-Martin *et al.*, 2013).

Vistos estos antecedentes, parece que alteraciones en la neurogénesis hipocampal adulta podrían desempeñar un papel central en el desarrollo de tauopatías como la AD. Además, puesto que el eje de estas patologías es la alteración del metabolismo de la proteína Tau, cabe pensar que ésta ejerza un papel relevante en el proceso fisiológico de generación de nuevas neuronas.

2. Proteína Tau

La proteína Tau es una MAP (*microtubule-associated protein*; proteína asociada a microtúbulos) que promueve el ensamblaje y la estabilización de los microtúbulos neuronales (Weingarten *et al.*, 1975; Cleveland *et al.*, 1977a; Cleveland *et al.*, 1977b; Fellous *et al.*, 1977). Hoy en día se sabe que desempeña importantes funciones fisiológicas en el desarrollo y mantenimiento de las neuronas, pero la mayoría de los estudios están centrados en su disfunción en las tauopatías.

2.1. Estructura e isoformas de la proteína Tau

En la proteína Tau se distinguen claramente dos dominios funcionales: el dominio de proyección y el dominio de unión a microtúbulos (Figura 5).

El dominio de proyección se denomina así debido a que se proyecta fuera de la superficie del microtúbulo, y se divide a su vez en una región amino terminal (Nt) y una región rica en prolinas. La región Nt es rica en cargas negativas, al igual que la superficie de los microtúbulos, lo cual da lugar a repulsiones electrostáticas entre ambos (Kar *et al.*, 2003; Amos, 2004). Su longitud es variable dependiendo de la isoforma, pudiendo contener uno, dos o ningún inserto Nt. La región rica en prolinas constituye un sitio de reconocimiento para quinasas. Se ha sugerido que este dominio de proyección es el lugar a través del cual Tau interacciona con otras moléculas y

proteínas celulares (Hirokawa *et al.*, 1988; Brandt *et al.*, 1995; Arrasate *et al.*, 1997; Arrasate *et al.*, 2000).

El dominio de unión a microtúbulos contiene también dos regiones: la región de las repeticiones y la región carboxilo terminal (Ct). Su función es unir Tau a la tubulina, lo cual promueve el ensamblaje de los microtúbulos (Aizawa *et al.*, 1989; Drechsel *et al.*, 1992). La región de las repeticiones contiene tres o cuatro (dependiendo de la isoforma) repeticiones de 31 o 32 aminoácidos. La región Ct es también rica en prolinas y contiene varios residuos susceptibles de fosforilación (Perez *et al.*, 2000).

El gen humano de la proteína Tau (gen *MAPT*) es de una sola copia, se localiza en el cromosoma 17q21 y contiene 16 exones (Neve *et al.*, 1986). En el sistema nervioso central (SNC) se expresan seis isoformas diferentes de Tau generadas como resultado del procesamiento alternativo de sus exones (Goedert *et al.*, 1989a; Andreadis *et al.*, 1992). La ausencia o presencia del exón 10 determina que haya 3 (Tau3R) o 4 (Tau4R) repeticiones en el dominio de unión a microtúbulos, y la de los exones 2 y 3 determina la longitud de la región Nt (Goedert *et al.*, 1989a; Goedert *et al.*, 1989b; Andreadis *et al.*, 1995; Goedert y Spillantini, 2001). En el sistema nervioso periférico (SNP) existe una isoforma de Tau de elevado peso molecular (aproximadamente 100 kDa), denominada *Big Tau*, en la que se expresa el exón 4a (Nunez, 1988; Couchie *et al.*, 1992) (Figura 6).

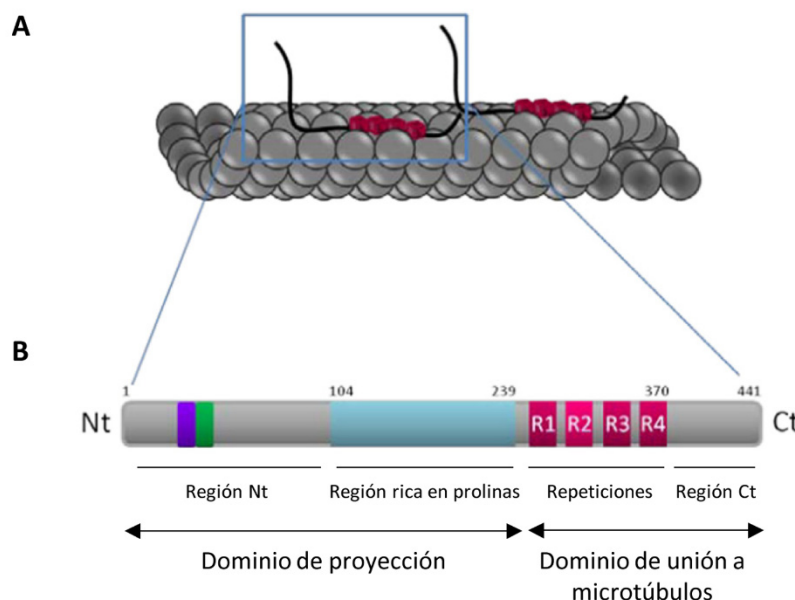


Figura 5. Estructura de la proteína Tau. (A) La proteína Tau interacciona con los microtúbulos a través de la región de las repeticiones, quedando el dominio de proyección orientado hacia el citoplasma. (B) Representación de las diferentes regiones de la isoforma de Tau humana más larga en el sistema nervioso central. El dominio de proyección consta de una región amino terminal (Nt), con sus correspondientes insertos Nt, y una región rica en prolinas. El dominio de unión a microtúbulos consta de una región de repeticiones y una región carboxilo terminal (Ct). Modificado de Gómez de Barreda, 2010.

La afinidad de Tau por los microtúbulos depende, por una parte, del número de repeticiones en la región de unión a microtúbulos, y por otra, de las modificaciones postraduccionales que sufra la proteína. Ambos puntos de control están sometidos a regulación, y permiten la adaptación de la función de Tau a los requerimientos celulares en cada momento concreto.

Así, durante el desarrollo se expresa fundamentalmente la isoforma Tau3R, la cual va siendo paulatinamente sustituida según va madurando el cerebro por las isoformas Tau4R, con mayor afinidad por los microtúbulos (Lu y Kosik, 2001; Avila *et al.*, 2004). De hecho, en las neuronas maduras del cerebro adulto de roedores la isoforma Tau3R no está presente (Figura 6). La menor afinidad por los microtúbulos de la isoforma Tau3R implica una menor estabilidad del citoesqueleto, lo cual es importante durante el desarrollo porque el citoesqueleto ha de ser suficientemente plástico para permitir la diferenciación morfológica de las neuronas y su migración. En relación a esto es importante remarcar que en las regiones neurogénicas del cerebro adulto murino se conserva la expresión de Tau3R (Bullmann *et al.*, 2007; Llorens-Martin *et al.*, 2012).

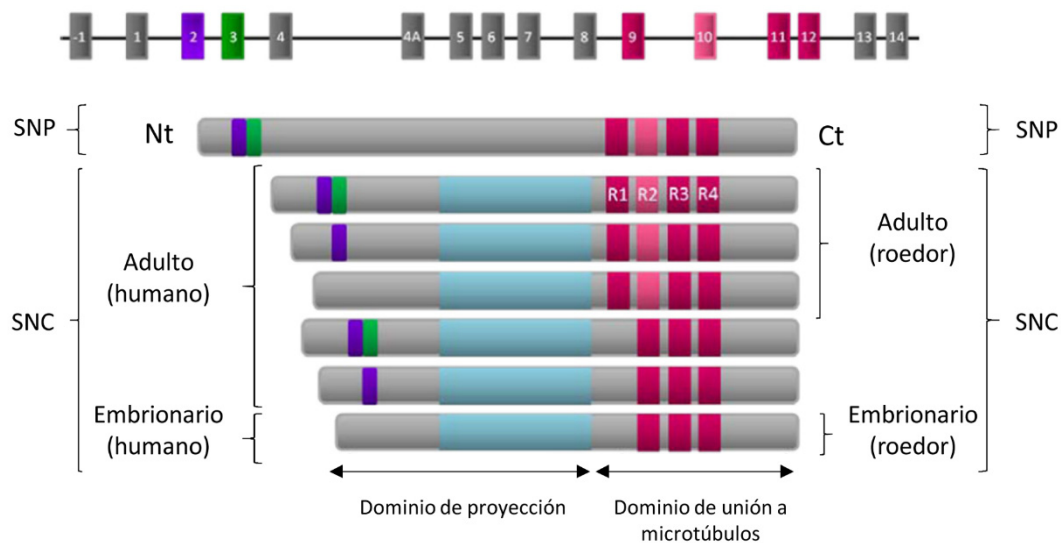


Figura 6. Isoformas de la proteína Tau en el sistema nervioso humano y de roedores. El procesamiento alternativo de los exones del gen de Tau (parte superior de la figura) da lugar a la expresión de diferentes isoformas de la proteína. En el sistema nervioso periférico (SNP) tanto de humanos como de roedores se expresa una isoforma de Tau de gran tamaño denominada “Big Tau”. En el sistema nervioso central (SNC) durante el desarrollo embrionario, tanto en humanos como en roedores, se expresa una isoforma de Tau con 3 repeticiones en el dominio de unión a microtúbulos (Tau3R). En el SNC adulto la isoforma Tau3R va siendo sustituida por otras isoformas con 4 repeticiones en el dominio de unión a microtúbulos (Tau4R). En humanos se mantiene la expresión de 2 isoformas de Tau3R en el adulto, pero en roedores desaparece completamente. Nótese que la proteína Tau humana es homóloga a la de roedores, pero no exactamente igual (tanto el gen como las isoformas de Tau son representaciones esquemáticas simplificadas). Modificado de Gómez de Barreda, 2010.

En cuanto a las modificaciones postraduccionales, la más importante en lo relativo a la regulación de la afinidad de Tau por los microtúbulos es la fosforilación: cuanto mayor sea su grado de fosforilación, menor será su afinidad por los microtúbulos (Brandt *et al.*, 1995). De hecho, la hiperfosforilación de Tau que ocurre en las tauopatías da lugar a su separación de los microtúbulos y su agregación en ovillos neurofibrilares (Avila *et al.*, 2004). Al igual que ocurría con las repeticiones, la fosforilación de Tau está fisiológicamente regulada para ser mayor en las neuronas inmaduras tanto durante el desarrollo embrionario (Brion *et al.*, 1993; Brion *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 2009) como en la neurogénesis adulta (Fuster-Matanzo *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010). Hasta el momento se han descrito fosforilaciones en al menos 30 residuos en la proteína Tau (Pevalova *et al.*, 2006). Su grado de fosforilación depende de la acción conjunta de quinasas y fosfatasas, siendo las más importantes GSK-3 β y PP2A (*Protein Phosphatase 2A*), respectivamente (Goedert *et al.*, 1995; Hanger *et al.*, 2009).

2.2. Distribución de la proteína Tau en el cerebro

Desde un punto de vista anatómico, la proteína Tau en el cerebro adulto se localiza fundamentalmente en la corteza, el hipocampo, el tálamo, el estriado y, en menor medida, el cerebelo (Goedert *et al.*, 1989b; Trojanowski *et al.*, 1989).

Es una proteína fundamentalmente neuronal, aunque también se ha descrito su presencia en células gliales (LoPresti *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2001), y fuera del sistema nervioso en fibroblastos (Ingelson *et al.*, 1996) y linfocitos (Thurston *et al.*, 1996).

En las neuronas, Tau se localiza preferentemente en el citoplasma unido a los microtúbulos, aunque también se ha observado su asociación con la membrana plasmática (Brandt *et al.*, 1995; Arrasate *et al.*, 2000) y con determinados orgánulos celulares como las mitocondrias (Rendon *et al.*, 1990) o los ribosomas (Papazosomenos y Su, 1991). Algunos estudios han llegado a detectar su presencia incluso en el núcleo celular (Loomis *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1993; Brady *et al.*, 1995; Greenwood y Johnson, 1995; Cross *et al.*, 2000).

Aunque se hayan detectado pequeñas proporciones de Tau en otras localizaciones, la mayor parte de la proteína se encuentra, en condiciones fisiológicas, unida a los microtúbulos. Inicialmente se pensaba que esta asociación se reducía exclusivamente a los microtúbulos del axón (Hirokawa *et al.*, 1996; Aronov *et al.*, 2001), pero en los últimos años se ha demostrado su presencia también en dendritas (Ittner *et al.*, 2010). Es más, aunque no se tiene todavía una confirmación definitiva, cada vez hay más evidencias indirectas de su presencia en las espinas dendríticas (Lee *et al.*, 1998; Gu y Zheng, 2009; Ittner *et al.*, 2010; Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2012; Kimura *et al.*, 2014).

2.3. Funciones fisiológicas de la proteína Tau

2.3.1. Establecimiento de la polaridad neuronal y migración

Los microtúbulos son estructuras muy dinámicas que, en la mayoría de las células, se encuentran en un constante proceso de polimerización y despolimerización denominado inestabilidad dinámica. Esta inestabilidad dinámica del citoesqueleto es lo que permite que ocurran cambios morfológicos y movimientos de la célula, y la estabilización selectiva de grupos determinados de microtúbulos en el momento adecuado es lo que da lugar a la polarización celular (Kirschner y Mitchison, 1986). El correcto establecimiento y mantenimiento de esta polaridad es un proceso especialmente importante en el caso de las neuronas, que son células altamente especializadas con un dominio axonal y un dominio somatodendrítico bien definidos (Mitchison y Kirschner, 1988; Witte *et al.*, 2008). La estabilización de la red microtubular necesaria para la adquisición de esta polaridad es posible gracias a modificaciones postraduccionales de la tubulina y a la unión de MAPs, entre las que se encuentra Tau (Conde y Caceres, 2009).

Diferentes estudios en cultivos neuronales han demostrado que en ausencia de Tau se produce un retraso en el crecimiento de las neuritas y en la especificación del axón (Caceres y Kosik, 1990; Dawson *et al.*, 2001), el cual es el primer dominio que se forma así como la localización principal de esta proteína. Además, en un estudio reciente *in vivo* en el que se eliminó Tau mediante electroporación *in utero* con RNAs (*ribonucleic acids*; ácidos ribonucleicos) de interferencia, se observaron alteraciones en la migración y en la formación del árbol dendrítico de las neuronas electroporadas (Sapir *et al.*, 2012). Sin embargo, en los modelos animales deficientes en la proteína Tau disponibles hasta el momento, no se observaron problemas de viabilidad ni anomalías importantes en el desarrollo del sistema nervioso (Harada *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 2001; Tucker *et al.*, 2001), lo cual se ha propuesto que podría ser debido a compensaciones de la función de Tau por otras MAPs (Ke *et al.*, 2012).

Puesto que la función principal de Tau está relacionada con la adquisición de la polaridad neuronal durante el desarrollo embrionario, cabría pensar que pudiese desempeñar un papel similar también durante la neurogénesis hipocampal adulta. Sin embargo, como se detallará más adelante, su implicación en este proceso está todavía poco estudiada.

2.3.2. Regulación del transporte axonal

La unión de Tau a los microtúbulos, además de estabilizarlos, también interfiere en su interacción con otras proteínas como los motores moleculares, que son los encargados del transporte a lo largo del axón de moléculas de señalización, factores tróficos y orgánulos como las mitocondrias (Ebner *et al.*, 1998; Stamer *et al.*, 2002; Vershinin *et al.*, 2007; Dixit *et al.*, 2008). Es por ello que se ha sugerido que Tau, a través de su unión y desunión a los microtúbulos (regulada por fosforilación), podría estar implicada en la regulación del transporte axonal (revisado en (Ballatore *et al.*, 2007; Hernandez y Avila, 2010)). Sin embargo, a pesar de las numerosas evidencias *in vitro*, esta función no ha podido ser demostrada *in vivo* en condiciones fisiológicas (Yuan *et al.*, 2008).

2.3.3. Tráfico intracelular de proteínas

A través de su dominio de proyección, la proteína Tau es capaz de interaccionar con numerosas proteínas relacionadas con funciones celulares muy diversas (Hernandez y Avila, 2010). Debido a esta elevada capacidad de unión a sustratos variados, se ha sugerido que Tau podría desempeñar un papel en la localización de otras proteínas en su lugar adecuado dentro de la célula. Ejemplos de esta función se han demostrado, por ejemplo, en los casos de las proteínas APP (*amyloid precursor protein*; proteína precursora amiloidea) (Lei *et al.*, 2012) y Fyn (Ittner *et al.*, 2010).

2.3.4. Proteína Tau y neurogénesis adulta

Como se ha detallado anteriormente, la proteína Tau desempeña un papel clave en la formación y maduración de las neuronas en el desarrollo embrionario. Durante este proceso, que requiere una elevada plasticidad del citoesqueleto celular, las isoformas mayoritarias (Lu y Kosik, 2001; Avila *et al.*, 2004) y las modificaciones postraduccionales de Tau (Brion *et al.*, 1993; Brion *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 2009) son diferentes a las que predominan en las neuronas maduras del cerebro adulto.

Datos previos de éste y otros laboratorios han demostrado la presencia tanto de Tau3R (Bullmann *et al.*, 2007; Llorens-Martin *et al.*, 2012) como de tau hiperfosforilado (Fuster-Matanzo *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010), ambos característicos de estadios de desarrollo, en las nuevas neuronas generadas en el hipocampo de ratones adultos, lo cual sugiere que Tau podría desempeñar también un papel en este proceso. De hecho, la proteína Tau3R, que colocaliza con una subpoblación de células DCX positivas, se ha propuesto como un nuevo marcador molecular

para el estudio de la neurogénesis adulta por ser el único marcador selectivo conocido del axón de las nuevas neuronas inmaduras (Llorens-Martin *et al.*, 2012).

Además, en diversos modelos animales de tauopatías se han encontrado alteraciones en la neurogénesis hipocampal adulta (Rodríguez *et al.*, 2008; Llorens-Martin *et al.*, 2011a; Komuro *et al.*, 2015), y recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión de una forma patológica de Tau específicamente en los precursores neuronales del DG da lugar a una disminución tanto en la proliferación como en la supervivencia de las nuevas neuronas (Pristera *et al.*, 2013).

2.4. Modelos animales para el estudio de la función de Tau

Con el objetivo de estudiar los mecanismos patológicos moleculares de las diferentes tauopatías se han generado a lo largo de los años numerosos modelos animales transgénicos y/o deficientes en Tau, la mayoría de ellos murinos (revisado en (Duyckaerts *et al.*, 2008; Gotz y Ittner, 2008)). Entre todos estos modelos, los únicos que permiten el estudio de la función fisiológica de Tau son los modelos deficientes en esta proteína (modelos *knockout*).

En la actualidad existen cuatro líneas distintas de ratones Tau *knockout* (Harada *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 2001; Tucker *et al.*, 2001; Fujio *et al.*, 2007). Cada una de ellas fue generada de forma independiente con distintas estrategias de recombinación homóloga para eliminar el exón 1 del gen *mapt*, que es el contiene la señal de inicio de la traducción (revisado en (Ke *et al.*, 2012)). El modelo utilizado en la presente tesis para estudiar el papel de la proteína Tau en la neurogénesis hipocampal adulta es el de Dawson y colaboradores, en el que la ausencia de proteína Tau se consiguió mediante el reemplazo del exón 1 del gen *mapt* por un cassette de resistencia a neomicina (NEO) (Dawson *et al.*, 2001).

Sorprendentemente, todos los modelos deficientes en Tau son viables y ninguno presenta alteraciones fenotípicas evidentes, al menos mientras son jóvenes (revisado en (Ke *et al.*, 2012; Lei *et al.*, 2014)). Se ha propuesto que esto podría ser debido a una compensación de la función de Tau por otras MAPs, lo cual se confirma, al menos parcialmente, al haberse encontrado un aumento en la cantidad de MAP1A durante el desarrollo en tres de los cuatro modelos (el de Harada, el de Dawson y el de Fujio) (Ke *et al.*, 2012).

La caracterización de las funciones de Tau llevada a cabo en estos modelos se detallará más en profundidad en el apartado de Discusión. Muy brevemente, se han encontrado retrasos en el desarrollo neuronal embrionario *in vitro* (Dawson *et al.*, 2001), alteraciones en la función sináptica (Ahmed *et al.*, 2014; Kimura *et al.*, 2014) y en la distribución de proteínas intracelulares

in vivo (Ittner *et al.*, 2010; Lei *et al.*, 2012), y déficits motores y cognitivos asociados mayoritariamente al envejecimiento (Ke *et al.*, 2012).

2.5. Neuroprotección por ausencia de Tau en condiciones patológicas

En los últimos años la reducción de los niveles de Tau se ha propuesto como una potencial estrategia terapéutica tanto para tauopatías (Medina y Avila, 2014) como para otras enfermedades como la epilepsia (Holth *et al.*, 2013). Esta potencial neuroprotección conferida por la ausencia de Tau, además de evitar la formación de agregados tóxicos y las alteraciones derivadas de su ganancia de función patológica, parece estar relacionada con el papel de Tau en las dendritas y en las sinapsis (Ittner y Gotz, 2011).

Las sinapsis, y en particular el compartimento postsináptico, son las estructuras principales en la transmisión de la toxicidad generada por diversos elementos extracelulares como, por ejemplo, las placas de proteína β -amiloide (Selkoe, 2002). Diversos estudios han demostrado que el tratamiento con β -amiloide provoca pérdida de sinapsis y espinas dendríticas, induce la LTD y disminuye la LTP a través de mecanismos de excitotoxicidad mediados por la sobreactivación de receptores de glutamato (Shankar *et al.*, 2008).

Como se discutirá en profundidad más adelante, en los últimos años se han publicado numerosos trabajos que sitúan a la proteína Tau en un lugar principal dentro de esta cascada de excitotoxicidad (Rapoport *et al.*, 2002; Roberson *et al.*, 2007; Ittner *et al.*, 2010; Roberson *et al.*, 2011). Así, aunque la presencia de Tau en las sinapsis aún no ha podido ser confirmada totalmente, se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que en su ausencia no se producen los efectos tóxicos derivados de la sobreactivación de receptores de glutamato subyacente a muchos procesos patológicos.

OBJETIVOS

En esta tesis nos propusimos estudiar el papel de la proteína Tau en el proceso de neurogénesis hipocampal adulta. Para ello empleamos un modelo murino deficiente en Tau que nos permitió llevar a cabo el análisis de las consecuencias tanto a nivel morfológico como funcional de la ausencia de esta proteína en la formación e integración de nuevas neuronas granulares en el hipocampo. Además, puesto que la neurogénesis adulta es un proceso plástico que permite la adaptación del individuo al ambiente que le rodea, analizamos el papel de Tau en la modulación de este proceso ante estímulos tanto positivos como negativos. Con estos fines nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudio descriptivo del papel de la proteína Tau en la neurogénesis hipocampal adulta en condiciones basales. Esta caracterización abarcará aspectos tales como la regulación de la tasa de neurogénesis, la maduración de las nuevas neuronas y las consecuencias comportamentales derivadas de la ausencia de Tau en tareas íntimamente relacionadas con la neurogénesis hipocampal adulta.
2. Estudio del papel de la proteína Tau en la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta en respuesta a un estímulo modulador positivo: enriquecimiento ambiental.
3. Estudio del papel de la proteína Tau en la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta en respuesta a un estímulo modulador negativo: estrés agudo producido por el test de Porsolt.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Anticuerpos

Los anticuerpos primarios utilizados en la inmunodetección de proteínas en inmunofluorescencia (IF) y en Western Blot (WB) se recogen en la **Tabla 2**.

En los ensayos de IF se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios conjugados Alexa: anti-ratón, anti-conejo, anti-rata, anti-cabra y anti-cobaya Alexa 488/555/633/647 a una dilución 1:1000 (Invitrogen), todos producidos en burro. Para el marcaje de núcleos se utilizó el marcador de ácidos nucleicos 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

En los estudios de WB se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios conjugados con HRP (*horseradish peroxidase*; peroxidasa de rábano): anti-ratón y anti-conejo producidos en cabra (DAKO), a una dilución 1:1000, y anti-cobaya producido en conejo (Invitrogen), a una dilución 1:3000.

1.2. Animales

El empleo de animales de experimentación se llevó a cabo siguiendo las directrices establecidas por la Unión Europea (86/609/EEC) y aprobadas por la Comisión de Bioética del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CBMSO, UAM-CSIC, Madrid, España). Los animales fueron alimentados y criados en el animalario del CBMSO. De forma general, exceptuando los grupos sometidos a enriquecimiento ambiental, se estabularon de 4 a 5 animales por jaula, con comida y agua disponibles *ad libitum*. Se mantuvieron en un ambiente con temperatura controlada y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas respectivamente, con el comienzo de la fase de luz a las 8:00 a.m.

Los estudios se llevaron a cabo en ratones deficientes en la proteína Tau (ratones Tau^{-/-}) (Dawson *et al.*, 2001)(Figura 7), que fueron cedidos amablemente por el Dr. M. P. Vitek (Duke University, Durham, USA). La línea se mantuvo cruzando ratones heterocigotos (Tau^{+/-}) entre sí para obtener ratones silvestres (*wild type*; WT) y ratones deficientes en Tau (Tau^{-/-}) con similar fondo genético (C57BL/6).

Anticuerpo primario	Proteína/Epítipo	Especie	Casa comercial	Dilución IF	Dilución WB
Anti-BLBP	Proteína cerebral de unión a ácidos grasos	Conejo	Abcam	1:300	
Anti-BrdU/CldU	5-bromo/cloro-2'deoxiuridina	Rata	Accurate Chemical & Scientific Corp	1:400	
Anti-calretinina	Proteína de unión a calcio, calretinina	Conejo	Swant	1:3000	
Anti-DCX	Proteína de unión a microtúbulos, doblecortina	Cabra	Santa Cruz	1:500	
Anti-fractina	Fragmento escindido de β -actina	Conejo	Life Span Biosciences	1:500	
Anti-GAD65	Glutamato decarboxilasa	Ratón	Developmental Studies Hybridoma Bank	1:500	1:1000
Anti-GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa	Ratón	Abcam		1:2000
Anti-GFP	Proteína verde fluorescente	Conejo	Life Technologies	1:1000	
Anti-GluR1	Receptor AMPA 1 de glutamato	Conejo	Abcam		1:1000
Anti-IdU	5-yodo-2'deoxiuridina	Ratón	BD Bioscience	1:500	
Anti-NeuN	Proteína neuronal de unión al ADN, NeuN	Ratón/Conejo	Millipore	1:1000	
Anti-NR2b	Receptor NMDA 2b	Conejo	Millipore		1:1000
Anti-p-NR2b	Receptor NMDA 2b fosforilado en Tyr1472	Conejo	Thermo Scientific		1:500
Anti-PH3	Histona H3 fosforilada en Ser10	Conejo	Millipore	1:250	
Anti-PSD95	Proteína de densidades postsinápticas 95	Cobaya	Synaptic Systems		1:1000
Anti-SNAP25	Proteína asociada a sinaptosomas 25	Conejo	Abcam		1:1000
Anti-SOX2	Factor de transcripción SOX2	Cabra	R&D Systems	1:400	
Anti-Tau 7.51	Proteína Tau (región de unión a microtúbulos)	Ratón	Cedido por C.M. Wischik		1:1000
Anti-Tau3R	Proteína Tau (isoforma con 3 repeticiones en el dominio de unión a microtúbulos)	Ratón	Millipore	1:500	1:1000
Anti-Tau4R	Proteína Tau (isoforma con 4 repeticiones en el dominio de unión a microtúbulos)	Ratón	Millipore		1:1000
Anti-Tau5	Proteína Tau (región central)	Ratón	Calbiochem		1:1000
Anti-VAMP2	Proteína asociada a membranas vesiculares 2	Conejo	Abcam		1:1000
Anti-vGLUT1	Transportador 1 de vesículas glutamatérgicas	Cobaya	Millipore	1:2500	
Anti-ZnT3	Transportador de zinc asociado a vesículas sinápticas	Conejo	Synaptic Systems	1:2000	1:1000
Anti- β -actina	β -actina	Ratón	Sigma		1:2000

Tabla 2. Anticuerpos utilizados y diluciones empleadas en inmunofluorescencia (IF) y Western Blot (WB).

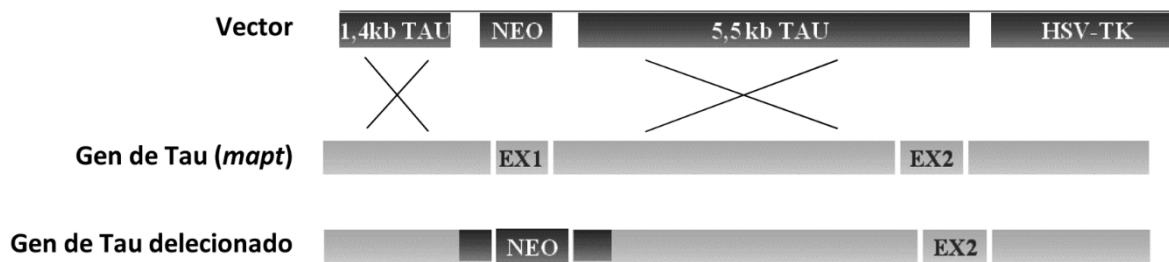


Figura 7. Esquema de la construcción empleada para generar el ratón *Tau*^{-/-}. Se introdujeron dos fragmentos del exón 1 del gen de la proteína Tau murina en el vector pPNT, uno de ellos de 1400 pb antes del cassette NEO (neomicina) y otro de 5500 pb entre los cassettes NEO y HSV-TK. Las cruces indican las zonas de recombinação homóloga entre el gen de la proteína Tau y el vector construido (Dawson et al., 2001). Modificado de Gómez de Barreda, 2010.

2. Métodos

2.1. Diseño experimental

De acuerdo a los objetivos previamente descritos, el diseño experimental constó de 4 subapartados: (1) validación del modelo murino deficiente en la proteína Tau, (2) estudio descriptivo del papel de Tau en la neurogénesis hipocampal adulta en condiciones basales, (3) estudio del papel de Tau en la neurogénesis hipocampal adulta en presencia de un estímulo modulador positivo del proceso (EA), y (4) estudio del papel de Tau en la neurogénesis hipocampal adulta en presencia de un estímulo modulador negativo de la misma (test de Porsolt).

La validación del modelo experimental (ausencia de proteína Tau) se llevó a cabo mediante WB, IF y PCR cuantitativa (qRT-PCR) en animales de 3 meses de edad.

Para el estudio descriptivo del papel de Tau en la neurogénesis hipocampal adulta en condiciones basales se utilizaron grupos de animales de aproximadamente 4 meses de edad. El análisis de la diferenciación, maduración e integración de las nuevas neuronas en el circuito hipocampal se llevó a cabo empleando diferentes aproximaciones experimentales: utilización de anticuerpos específicos e inyección de análogos de timidina para estudiar la generación, diferenciación y supervivencia neuronal; infección con retrovirus para estudiar la maduración morfológica de las dendritas, espinas dendríticas y terminales axónicos de las nuevas neuronas; y análisis mediante microscopía electrónica de la ultraestructura de los axones de las neuronas granulares. Además, estos estudios se completaron con diferentes pruebas comportamentales.

Para el estudio del papel de Tau en la neurogénesis hipocampal adulta en presencia de un estímulo modulador positivo de la misma se sometió a los animales a un protocolo de EA de 8 semanas de duración (Llorens-Martin *et al.*, 2007; Llorens-Martin *et al.*, 2010).

Como estímulo modulador negativo de la neurogénesis hipocampal adulta se utilizó el estrés agudo producido por el test de natación forzada o test de Porsolt (Llorens-Martin *et al.*, 2011b).

Tanto en el caso del EA como en el del test de Porsolt se utilizaron técnicas y grupos de animales de características similares a las utilizadas en el estudio descriptivo en condiciones basales (anticuerpos específicos para neurogénesis adulta, inyección de análogos de timidina e infección con retrovirus). Todos los animales tenían aproximadamente 4 meses de edad en el momento del sacrificio.

Los diferentes grupos experimentales empleados, así como los tratamientos a los que fueron sometidos, quedan recogidos en la **Figura 8**. En todos los casos se utilizaron grupos de entre 6 y 10 animales por genotipo y condición experimental, a excepción de los grupos infectados con retrovirus en los que se utilizaron 3 animales.

2.2. Marcaje de nuevas neuronas *in vivo* con análogos de timidina

Para analizar la supervivencia y la diferenciación de grupos de neuronas de edades conocidas se les administraron a los animales diferentes análogos de timidina: 5-iodo-2'-deoxiuridina (Iododeoxiuridina; IdU) y 5-cloro-2'-deoxiuridina (Clorodeoxiuridina; CldU) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Estos análogos sustituyen a la base nitrogenada timidina en el DNA de las células en división, quedando incorporados durante toda su vida. De esta manera, utilizando anticuerpos que reconocen específicamente cada análogo, es posible detectar grupos de neuronas que se formaron en el momento de administración de los mismos.

El análogo CldU se administró mediante inyección intraperitoneal en una única dosis de 42,75 mg/Kg de peso del animal (Llorens-Martin *et al.*, 2010).

El análogo IdU se administró de forma oral (disuelto en el agua de bebida) durante 24 horas con una dosis de 0,92 mg/ml. La dosis de IdU utilizada es equimolar a la dosis de BrdU recomendada para administración oral (Lugert *et al.*, 2010).

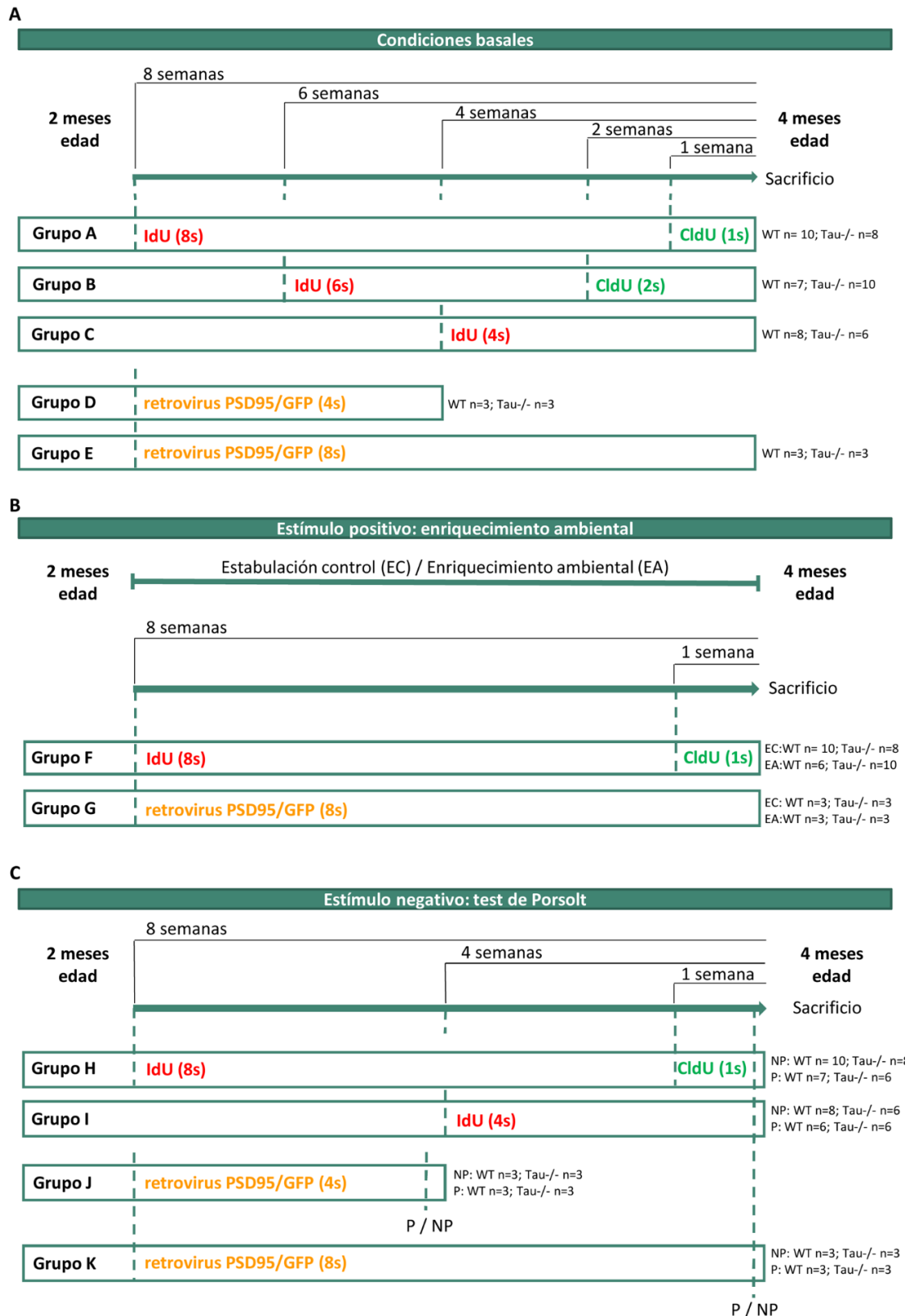


Figura 8. Esquema representativo de los grupos de animales utilizados y sus correspondientes tratamientos. Se indican los animales utilizados para el estudio del papel de Tau en la neurogénesis hipocámpal adulta en condiciones basales (A) y en presencia de estímulos moduladores positivos (EA) (B) y negativos (test de Porsolt) (C) de la misma. En cada caso se indican las edades de los animales al principio y al final de cada tratamiento, los puntos temporales de administración de los distintos análogos de timidina y de inyección de los retrovirus, y el tiempo transcurrido en cada caso hasta el momento del sacrificio. EC: estabulación control; EA: enriquecimiento ambiental; P: grupos sometidos al test de Porsolt; NP: grupos no sometidos al test de Porsolt (no Porsolt).

2.3. Marcaje de nuevas neuronas *in vivo* con retrovirus

2.3.1. Producción de los retrovirus

Con el objetivo de analizar la maduración morfológica de las nuevas neuronas generadas en el DG de los ratones Tau-/- se utilizaron retrovirus que codifican para la proteína PSD95 fusionada con GFP (*Green Fluorescent Protein*) (retrovirus PSD95-GFP), amablemente cedidos por el Dr. C. Lois (Kelsch *et al.*, 2008). Este virus permite la visualización selectiva en las nuevas neuronas tanto de las PSDs (resultado de la expresión de la proteína PSD95 acoplada a GFP), como de la morfología neuronal (resultado de la amplificación mediante inmunofluorescencia de la señal de la GFP en su tráfico intracelular).

La producción de los virus se llevó a cabo transfectando células 293T en placas P100 con 3 plásmidos empaquetadores (6 µg de cmv_gp, 4 µg de cmv_vsvg y 6 µg de pcIECO) y 9 µg del plásmido a empaquetar, utilizando Lipofectamine y Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen). A las 5 y a las 24 horas se les cambió el medio (DMEM 10%) añadiendo 5 ml de medio fresco. Transcurridas 24 horas desde el último cambio se filtró el medio con un filtro de 0,45 µm de diámetro de poro. A continuación se concentraron las partículas víricas centrifugando a 26000 rpm, en vacío y en rotor flotante, durante 2 horas a 4°C. Por último, se resuspendió el pellet en tampón fosfato salino (PBS) 1X pH 7,4 (NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1,8 mM). Una vez producidos, los virus fueron conservados hasta su utilización a -80°C. En cada empaquetamiento se utilizó una alícuota para la titulación de los virus mediante citometría de flujo. Brevemente, se infectaron células 293T con diluciones seriadas del virus, y transcurridas 72 horas las células se levantaron y se analizaron mediante citometría de flujo en el canal FL1 para la expresión de la proteína GFP. De esta manera se obtuvo el n° de unidades infectivas por ml (UI/ml). Los virus producidos tuvieron un título entre 10⁶ y 10⁷ UI/ml.

2.3.2. Inyección estereotáxica de retrovirus

Los ratones fueron anestesiados mediante una aplicación inhalatoria de isoflurano mezclado con oxígeno utilizando el equipo McKinley Anaesthetic Machine (MK-TCIII). El flujo de oxígeno medicinal fue de 1L/min, y el isoflurano se aplicó al 4% para la inducción y al 2% durante el mantenimiento. Una vez dormidos, se colocaron en un estereotáxico específico de ratón (Stoelting) de tal manera que el cráneo del animal quedase plano. Durante toda la operación se continuó con la aplicación de la anestesia mediante una mascarilla acoplada a la cabeza del ratón. Utilizando un bisturí estéril se realizó una incisión en la piel de la cabeza para dejar accesible el cráneo. Con un bastoncillo de algodón se aplicó H₂O₂ para desinfectar la zona y visualizar fácilmente la unión de los huesos craneales y el punto Bregma. Con ayuda de agujas de punta roma

2.4. Enriquecimiento ambiental

A clear plastic storage bin filled with wood shavings bedding. Inside are several colorful toys: a green bell toy, a blue bell toy, a purple bell toy, a pink bell toy, a yellow bell toy, a red bell toy, a white bell toy, and a small orange ring.

Figura 9. Jaula de enriquecimiento ambiental.

2.5. Pruebas de comportamiento

Para estudiar en profundidad las posibles implicaciones del efecto de la ausencia de Tau sobre la neurogénesis hipocampal adulta se sometió a los ratones a diferentes pruebas comportamentales relacionadas con el hipocampo.

2.5.1. Test de discriminación de patrones (*Novel Location Preference Test*)

El “*pattern separation*” se define como la capacidad de formar patrones de actividad neuronal distintos para diferenciar dos contextos muy similares, y está íntimamente relacionado con la neurogénesis hipocampal adulta (Deng *et al.*, 2010; Aimone *et al.*, 2011; Sahay *et al.*, 2011). Para estudiar este tipo de memoria en los ratones se utiliza la prueba comportamental denominada *Novel Location Preference Test*.

El test se realizó a lo largo de 3 días consecutivos, y se llevó a cabo en una caja cuadrada de metacrilato transparente de 45 x 45 cm. Cada día se dejó al ratón explorar durante 10 minutos dentro de la caja, en la que se introdujeron cambios sutiles de contexto: el primer día se situó al ratón en la caja vacía para que se habituase al espacio; el segundo día se introdujeron dos objetos iguales en posiciones simétricas en el centro de la caja; el tercer día uno de los objetos se cambió a una posición más periférica, mientras que el otro permaneció en su posición inicial (**Figura 10 A-B**). El análisis del test se llevó a cabo cuantificando la capacidad del ratón para reconocer el tercer día el cambio en la posición del objeto. Para ello se grabó el movimiento del animal para su posterior visualización y se calculó el índice de memoria (tiempo que pasa el ratón explorando el objeto en la nueva posición dividido entre la suma del tiempo de exploración de los dos objetos). Se consideraron exploraciones cuando el ratón se acercaba al objeto y lo olfateaba o tocaba activamente.

2.5.2. Test del laberinto en cruz elevado (*Elevated Plus Maze test*)

El *Elevated Plus Maze* (EPM) es un test que se utiliza para analizar el comportamiento de tipo ansiedad que presentan los animales, el cual está íntimamente relacionado con la función hipocampal (Snyder *et al.*, 2009).

El test consiste en colocar al ratón durante 5 minutos en un laberinto en cruz que se encuentra elevado 450 mm del suelo y que consta de dos brazos abiertos (sin paredes) y dos brazos cerrados (con paredes) (Cibertec, Madrid, España) (**Figura 10 C-D**). Puesto que los ratones tienen preferencia por los espacios cerrados, pero también un fuerte instinto explorador, el número de veces que entran en los brazos abiertos y el tiempo que permanecen en ellos aporta información acerca de su estado de ansiedad (cuanto mayor sea su grado de ansiedad menos se

atreverán a abandonar su zona de confort en los brazos cerrados). Se grabó el movimiento de los ratones en el laberinto y posteriormente se analizó el tiempo de exploración en los brazos abiertos, considerándose entrada cuando la cabeza y las patas delanteras entraban en el brazo.

2.5.3. Test de natación forzada (*Porsolt test*)

El test de natación forzada o test de Porsolt tiene una utilidad doble: por una parte se utiliza para analizar comportamientos de tipo depresivo, y por otra parte se utiliza como una herramienta para inducir estrés agudo (Porsolt *et al.*, 1977a; Porsolt *et al.*, 1977b). Tanto el comportamiento de tipo depresivo como la respuesta ante el estrés producido por este test están íntimamente relacionados con la neurogénesis hipocampal adulta (Llorens-Martin *et al.*, 2011b).

Brevemente, los animales se colocaron en un cilindro de metacrilato transparente de 12 cm de diámetro y 29 cm de altura lleno de agua a 23°C, dos días consecutivos durante 6 minutos cada día (**Figura 10 E-F**). El primer día supone la inducción de un estrés agudo en los animales que les causa un estado de tipo depresivo. El segundo día se analiza la resistencia de los animales a la depresión inducida previamente. Se grabó a los animales ambos días, aunque el análisis se llevó a cabo en las grabaciones del día 2. Los resultados se expresan como % de tiempo que pasan en inmovilidad (tiempo en el que no están nadando ni flotando activamente). Para el análisis se descarta el primer minuto de grabación (Detke *et al.*, 1995).

2.6. Sacrificio de los animales

Los animales fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol S.A.) (60 mg/Kg de peso) y perfundidos transcardialmente con 50 ml de tampón salino (NaCl 0,9%). Seguidamente se extrajo el cerebro y fue seccionado por la línea media separando ambos hemisferios, uno de los cuales fue destinado a técnicas histológicas y el otro a técnicas bioquímicas. Los cerebros de los animales infectados con retrovirus fueron utilizados únicamente para técnicas histológicas, por lo cual fueron perfundidos transcardialmente con paraformaldehído (PFA) 4% (Electron Microscopy Science) después del tampón salino para proceder a continuación con el protocolo correspondiente a este tipo de muestras.

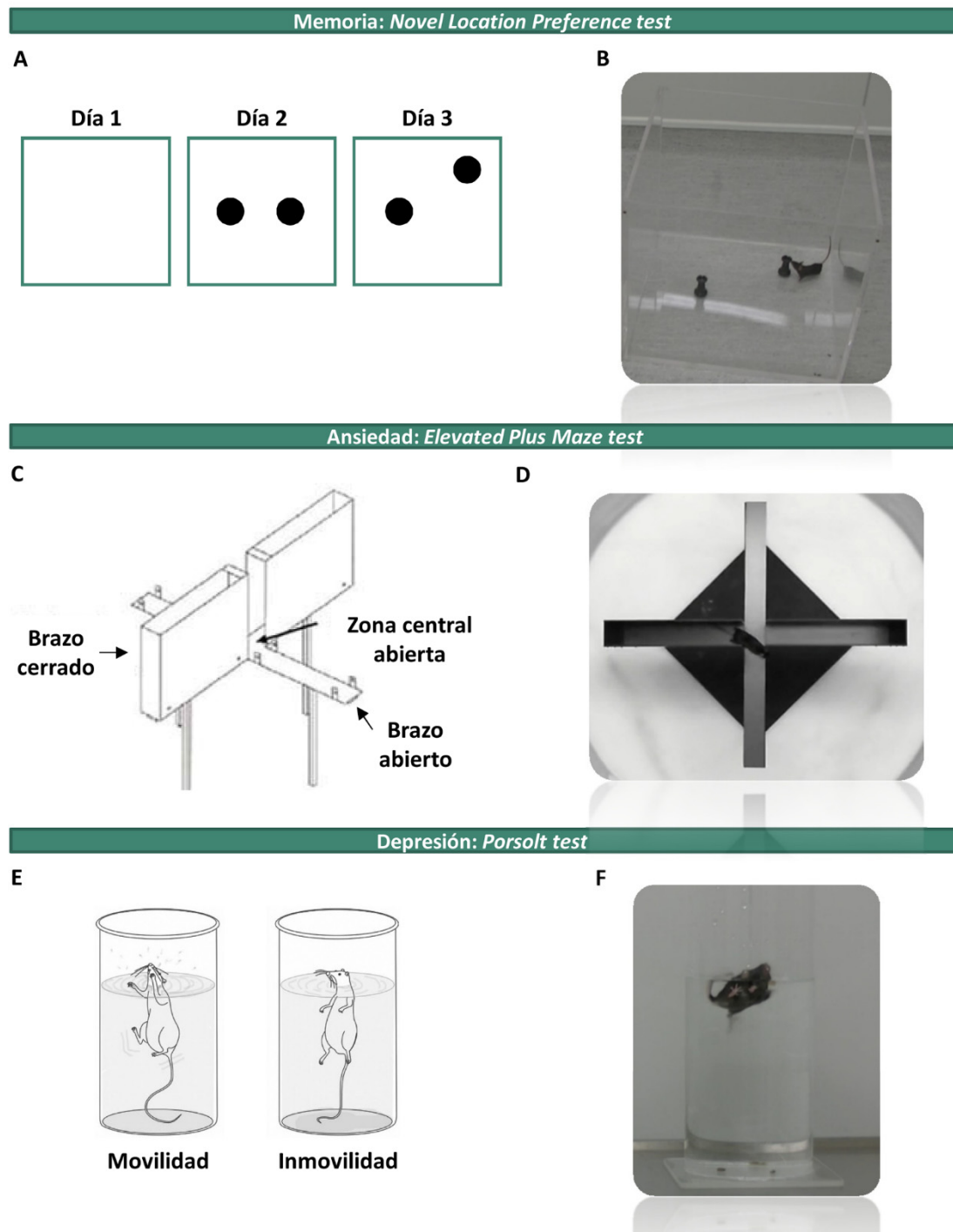


Figura 10. Pruebas de comportamiento. (A-B) *Novel Location Preference test*. (A) Posición esquemática de los objetos en la caja a lo largo de los 3 días de test. (B) Imagen de un ratón durante el desarrollo del test el tercer día. (C-D) *Elevated Plus Maze test*. (C) Esquema representativo del laberinto en cruz elevado. (D) Imagen de un ratón durante el desarrollo del test. (E-F) *Porsolt test*. (E) Representación de un ratón en movimiento y otro inmóvil durante el test de Porsolt. (F) Imagen de un ratón en posición de movimiento activo durante el desarrollo del test.

2.7. Procesamiento del tejido

Los hemisferios destinados a técnicas histológicas fueron fijados en PFA 4% durante toda la noche. Al día siguiente se lavaron 3 veces con tampón fosfato (PB) 0,1N pH 7,4 (14 g de K_2HPO_4 y 2,65 g de NaH_2PO_4 en 1 litro de H_2O), y posteriormente fueron incluidos en una mezcla de sacarosa 10% y agarosa 4% en PB 0,1N. Los bloques de cerebro incluidos se cortaron en secciones sagitales de 50 μm de grosor en un vibratomo VT1200S (Leica). Se hicieron series de cortes compuestas por uno de cada 8 cortes, de tal manera que la separación entre cada corte y el siguiente fue de 400 micras. Las series se conservaron inicialmente en PB 0,1N a 4°C, y aquellas que no fueron utilizadas en un plazo corto de tiempo fueron preservadas a -20°C inmersas en glicol, una solución crioprotectora compuesta por etilenglicol 30%, glicerol 30% y PB 0,2N 10%.

Los hemisferios destinados a técnicas bioquímicas se diseccionaron extrayendo las estructuras deseadas, habitualmente hipocampo y corteza, y fueron congelados en hielo seco y posteriormente almacenados a -80°C.

2.8. Técnicas histológicas

2.8.1. Inmunofluorescencia de tejido

Las secciones conservadas en glicol fueron lavadas 3 veces con PB 0,1N y atemperadas durante 30 minutos antes de comenzar con el protocolo de inmunofluorescencia. Una vez preparadas se incubaron durante 48-72 horas con los anticuerpos primarios (ver **Tabla 2**) diluidos en solución de bloqueo (BSA 1% y Triton-X-100 1% en PB 0,1N) a 4°C con agitación suave. Tras la incubación se efectuaron 5 lavados con la solución de bloqueo, y seguidamente se incubaron los cortes con los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa (ver apartado 1.1) diluidos en esta misma solución, toda la noche también a 4°C con agitación suave. Al día siguiente, después de 3 lavados con PB 0,1N, las secciones se incubaron con DAPI (Merck) diluido 1:5000 en PB 0,1N durante 10 minutos para marcar los núcleos celulares. Finalmente, tras retirar el exceso lavando 3 veces con PB 0,1N se procedió a montar las secciones en portaobjetos utilizando un medio de montaje preparado en el laboratorio a base de glicerol y mowiol (33% glicerol, 13% Mowiol 4-88 y 66% Tris-HCl 0,2M pH 8,5).

Aunque éste fue el protocolo general de inmunofluorescencia aplicado, algunos de los anticuerpos primarios utilizados requirieron pasos adicionales previos a su incubación. Para la detección de Sox2 y Tau3R fue necesario tratar las secciones con Vector® Antigen Unmasking Solution (Vector Laboratories) para exponer el antígeno. Brevemente, las secciones fueron sumergidas en la solución de desenmascaramiento antigénico (*antigen retrieval*) y calentadas en

el microondas hasta su ebullición. Acto seguido se mantuvieron en un baño a 80°C durante 20 min, y después otros 20 min a temperatura ambiente (Llorens-Martin *et al.*, 2012). Para detectar los análogos de timidina las secciones fueron incubadas con HCl 2N a temperatura ambiente durante 30 minutos para provocar la desnaturalización de la doble hélice de DNA y permitir el reconocimiento del análogo incorporado.

2.8.2. Medición del volumen del DG y del área de la SGL

Para la estimación de estos parámetros se utilizó una de las series de secciones de cada animal (ver apartado 2.7). Las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados y permanecieron secándose alrededor de una semana para lograr una buena adherencia. Una vez preparadas se sometieron a la tinción de Nissl, que marca específicamente los ácidos nucleicos. El protocolo consistió en la tinción de las secciones incubándolas en una solución de azul de toluidina 1^o/00 pH 4 durante 8 minutos, la deshidratación progresiva mediante inmersión en baños de 2 minutos de etanol de graduación creciente (70%, 96%, 100% I, 100% II), y la inmersión en xileno durante 2 minutos previa a su montaje utilizando medio hidrofóbico DePex (Serva Electrophoresis GmbH). Una vez secas, se tomaron fotografías de cada una de las secciones que conforman la serie utilizando un objetivo 2,5x en un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara CCD.

Tanto la medida del volumen del DG como del área de la SGL se llevaron a cabo siguiendo el método de Cavalieri (Pakkenberg y Gundersen, 1988).

En el caso del volumen del DG se midió el área de esta estructura en cada sección delimitando manualmente el borde de la capa granular con ayuda del software ImageJ (ImageJ, v. 1.33, NIH, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij>). La estimación del volumen del DG se obtuvo de la suma de todas las áreas multiplicado por la distancia entre dos secciones consecutivas de la serie (400µm, resultado de las 50 µm de grosor de cada sección multiplicado por 8 que es el número de secciones entre 2 consecutivas).

Para calcular el área de la SGL se midió en cada sección la longitud de esta estructura mediante el uso del software ImageJ. Al igual que en el caso del volumen del DG, el área total de la SGL se obtuvo de la suma de todas las longitudes multiplicado por la distancia entre dos secciones consecutivas de la serie. El dato calculado para la SGL es un área y no un volumen debido a que esta estructura se define teóricamente como la línea comprendida entre los somas de las neuronas granulares y el hilus, lo cual es equivalente en el espacio a un plano carente de volumen. En este plano se encuentran dispuestos los precursores neuronales (Llorens-Martin *et al.*, 2006).

2.8.3. Cuantificación de células

Los recuentos de células positivas para los marcadores Sox2, BLBP, DCX y calretinina fueron llevados a cabo mediante la técnica del disector físico acoplado a microscopía confocal (Llorens-Martin *et al.*, 2006). Para cada uno de los marcadores se realizaron 6 disectores escogidos de forma aleatoria en una de las series de secciones de cada animal analizado. Los disectores se adquirieron con un objetivo 63x de un sistema de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss). Cada disector consta de 11 planos separados entre sí 1,73 μm (tamaño del disector 103,7 x 103,7 x 17,3 μm). En cada disector se contaron las células positivas para el marcador correspondiente excluyendo aquellas contenidas en el primer plano y en el borde izquierdo (disectores abiertos). Para cada disector se calculó la densidad de células en la SGL (n° células/ μm^2). La estimación del número de células positivas en toda la SGL del animal se obtuvo multiplicando la densidad media de los 6 disectores por el área total de la SGL calculada previamente (ver apartado 2.8.2) (Llorens-Martin *et al.*, 2006).

El conteo de células positivas para los marcadores CldU, IdU, PH3 y fractina se realizó siguiendo el método de los disectores ópticos (Llorens-Martin y Trejo, 2011). Se contaron las células positivas para cada marcador en todas las secciones de una de las series de cada animal utilizando un objetivo 40x de un microscopio de fluorescencia vertical Axioskop2 plus (Zeiss). Para cada sección se calculó la densidad de células positivas dividiendo entre el volumen de DG correspondiente a esa sección (ver apartado 2.8.2). Para la estimación del número total de células positivas en el DG del animal se multiplicó la densidad media de todas las secciones por el volumen total de DG de ese animal.

El estudio de colocalizaciones entre los análogos de timidina y otros marcadores celulares se llevó a cabo analizando entre 100 y 200 células positivas para el análogo correspondiente, obtenidas entre todos los animales del grupo experimental. Para ello se tomaron imágenes individuales de cada célula utilizando un objetivo 63x de un sistema de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss). Los datos se presentan como % de células que son positivas para CldU o IdU y para el marcador correspondiente.

2.8.4. Análisis de la señalización aferente en la capa molecular del DG

El análisis de la señalización aferente en la capa molecular del DG se llevó a cabo comparando el área ocupada por los marcadores vGLUT-1 (*vesicular Glutamate Transporter 1*) y GAD-65 (*Glutamate Descarboxylase 65*) en los animales Tau-/- y en los WT. Para ello se tomaron imágenes de 24,1 x 24,1 μm utilizando un objetivo 63x de un sistema de barrido láser confocal

LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss). Se analizaron 3 imágenes por animal en cada zona de la capa molecular (interna, media y externa). Cada zona se analizó de manera independiente estableciendo un umbral de intensidad de fluorescencia para cada marcador, y los resultados se presentan como % de área ocupada por vGLUT-1 o por GAD-65.

2.8.5. Cuantificación de parámetros morfométricos

El análisis morfométrico de las nuevas neuronas se llevó a cabo en animales infectados con retrovirus PSD95-GFP (ver apartado 2.3). Se analizaron neuronas de 4 y 8 semanas de edad según el diseño experimental recogido en la **Figura 8**. El análisis de neuronas de 4 semanas de edad permite el estudio de la maduración dendrítica y la formación de PSDs y terminales axónicos. A las 8 semanas, cuando las nuevas neuronas se consideran ya totalmente maduras (*Ge et al., 2008*), se puede estudiar su morfología y conectividad estando ya integradas en el circuito hipocámpal.

Se utilizaron 3 series de cada animal para la detección mediante inmunofluorescencia de las proteínas PSD95 y GFP. La fluorescencia de la GFP acoplada a PSD95 (canal verde) permite la visualización de las PSDs. Además, utilizando un anticuerpo primario anti-GFP con un secundario Alexa 555 (canal rojo) se amplifica la señal de la GFP en su transporte intracelular permitiendo la visualización de toda la morfología neuronal.

2.8.5.1. Cuantificación de la longitud y ramificación dendrítica

Para el análisis morfométrico del árbol dendrítico se seleccionaron aleatoriamente entre los animales infectados un mínimo de 30 neuronas de cada genotipo y condición experimental. Las neuronas seleccionadas fueron reconstruidas utilizando un objetivo 25x de un sistema de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss). Los conjuntos de imágenes en Z (stacks) se obtuvieron con una separación entre planos de 2 μm y un grosor en Z que recogiera la totalidad de la neurona. A partir de la proyección en Z de estos stacks se llevaron a cabo los análisis de longitud y de arborización dendrítica (análisis de Sholl). Para ello se trazaron las neuronas utilizando el plugin NeuronJ del software ImageJ. El análisis de Sholl se llevó a cabo con el plugin ShollAnalysis de ImageJ. Se cuantificaron las intersecciones de las dendritas con círculos concéntricos trazados a partir del soma de la neurona y separados entre sí 10 μm . Los resultados se muestran agrupados en tramos de 50 μm .

2.8.5.2. Cuantificación del número y tamaño de las PSDs

El análisis de las PSDs se llevó a cabo de forma independiente para cada orden de ramificación dendrítica (Llorens-Martin *et al.*, 2013). Se analizaron un mínimo de 30 segmentos dendríticos de cada orden de ramificación seleccionados aleatoriamente entre los animales de cada genotipo y condición experimental. Para ello se tomaron imágenes de 67,4 x 67,4 μm utilizando un objetivo 63x de un sistema de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss). El intervalo entre los planos de los stacks fue de 0,2 μm , siendo el tamaño en Z el necesario para englobar todo el segmento dendrítico. El análisis se llevó a cabo a partir de la proyección en Z de los dos canales (verde y rojo). En el canal rojo se midió la longitud de cada segmento dendrítico, y en el canal verde se analizó el número y tamaño de las PSDs (*clusters* PSD95 positivos) contenidas en esos segmentos utilizando el plugin semiautomático Particle Analyzer de ImageJ.

2.8.5.3. Cuantificación del tamaño de los terminales axónicos

Puesto que el tráfico intracelular de la proteína GFP permite visualizar toda la morfología neuronal, con esta técnica es posible analizar también el área de los terminales axónicos en CA3 de las neuronas infectadas. Para ello se tomaron imágenes en esta zona de 100 x 100 μm utilizando un objetivo 63x de un sistema de barrido láser confocal LSM710 acoplado a un microscopio vertical AxioImager.M2 (Zeiss). El intervalo entre los planos de los stacks fue de 0,5 μm , siendo el tamaño en Z el necesario para englobar todos los terminales del campo. Se tomaron un mínimo de 20 imágenes por genotipo y condición experimental. Para identificar los terminales axónicos se siguieron criterios anteriormente descritos (Toni *et al.*, 2008). La cuantificación del área se llevó a cabo en las proyecciones en Z del canal de la GFP (canal rojo) utilizando el software ImageJ.

Se analizó el tamaño de los terminales axónicos, pero no su número, debido a que el número células infectadas en cada animal depende de parámetros relacionados con cada inyección particular del retrovirus, y por lo tanto no es posible llevar a cabo un recuento del número de terminales axónicos observados (Zhao *et al.*, 2006).

2.8.6. Microscopía electrónica

El análisis de la ultraestructura de los axones de las neuronas granulares del DG del hipocampo mediante microscopía electrónica fue llevado a cabo en el laboratorio del Dr. García Verdugo (Universitat de València, Valencia, España).

Se utilizaron 3 ratones WT y 4 ratones Tau^{-/-}, todos de 4 meses de edad. Los animales fueron anestesiados y perfundidos transcardialmente con NaCl 0,9% seguido de PFA 2% y glutaraldehído 2,5%. Se extrajeron los cerebros y se postfijaron durante toda la noche con la misma mezcla fijadora. Al día siguiente los cerebros se cortaron en secciones sagitales de 200 µm que fueron procesadas para microscopía electrónica.

El procesamiento de las secciones consistió en su postfijación con OsO₄ 2% durante 2 horas, seguida de su lavado, deshidratación e inclusión en Durcupan (Durcupan, Fluka). Posteriormente se realizaron secciones semifinas seriadas (1,5 µm) con una cuchilla de diamante. Estas secciones fueron teñidas con azul de toluidina 1% para visualizar la región de interés (hipocampo). Una vez localizada, se realizaron secciones ultrafinas de esta zona (50-70 nm). Estas secciones fueron marcadas con citrato de plomo y analizadas con un microscopio electrónico Fei Tecnai Spirit.

Se analizaron 100 axones por animal localizados en la región CA3, habiéndose medido su diámetro en su espesor máximo.

2.9. Técnicas bioquímicas

2.9.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para determinar el genotipo de los ratones se extrajo el DNA genómico de una pequeña porción de la cola de los animales. El fragmento de tejido fue digerido en NaOH 50mM a 100°C y 1400 revoluciones por minuto (rpm) durante 30 minutos. La digestión fue neutralizada añadiendo un décimo del volumen de la digestión de Tris-HCl 1M pH 8. Se separaron los restos no digeridos mediante centrifugación a 14000 rpm durante 10 minutos. El DNA presente en el sobrenadante se utilizó para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Mullis y Faloona, 1987), utilizándose los oligonucleótidos indicados en la **Tabla 3**.

TRANSGÉN	OLIGONUCLEÓTIDOS GENOTIPADO	
	SENTIDO	ANTISENTIDO
Banda tau murino WT	TTGAATCTCTCCCTGGACATGG	TTGTGTCAAACCTCTGGCGAG
Banda NEO	TTGAATCTCTCCCTGGACATGG	CTTCTATCGCCTTCTTGACGAG

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para el genotipado de los ratones Tau^{-/-}.

La PCR se llevó a cabo en un medio que contenía el tampón de la Taq DNA polimerasa (5X), la mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP) a una concentración 0,25mM, $MgCl_2$ 1,5mM, los tres oligonucleótidos a una concentración 0,5 μ M cada uno, 2 μ l de DNA, 10% DMSO y 1U de Taq DNA polimerasa (Promega), en un volumen final de 20 μ l. El protocolo de amplificación consistió en 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, seguido de 30 segundos a 60°C y 1 minuto a 72°C. La amplificación dio lugar a un fragmento de 800 pb para el alelo tau WT y un fragmento de 600 pb para el alelo tau mutado. Ambos fragmentos se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% conteniendo SYBR Safe (Invitrogen) (Figura 11).

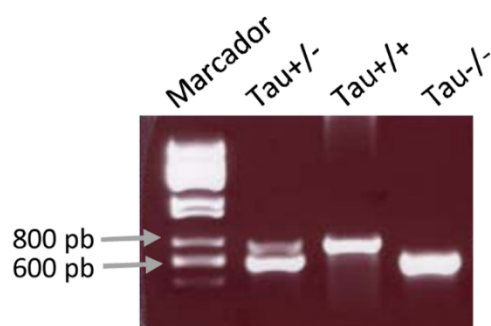


Figura 11. Genotipado de los ratones Tau^{-/-} y sus controles (Tau^{+/+}) mediante PCR. Amplificación de la secuencia codificante de la proteína Tau WT (800pb) y de la secuencia codificante del gen de resistencia a neomicina (600pb). Este último fragmento de 600pb corresponde al alelo Tau mutado.

2.9.2. PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Los animales utilizados para este experimento fueron sacrificados mediante el uso de una cámara de CO₂. Acto seguido se diseccionaron los cerebros para extraer los hipocampos, que fueron inmediatamente conservados en RNAlater® Tissue Collection (Life Technologies). Tanto la extracción del RNA como la elección de los oligonucleótidos sonda y el experimento de qRT-PCR fueron llevados a cabo por la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid (Cantoblanco, Madrid).

Se extrajo el RNA utilizando el kit de extracción RNeasy mini kit (Qiagen), y 20 ng/ μ l de RNA se transcribieron a cDNA (*complementary DNA*; DNA complementario) utilizando el kit High Capacity RNA to cDNA (Life Technologies).

A continuación se analizó la expresión del gen *mapt* en 3 regiones mediante PCR a tiempo real utilizando sondas TaqMan® (Life Technologies). Las sondas utilizadas, así como las regiones del gen con las que hibridan, se recogen en la **Tabla 4**.

Las condiciones de amplificación fueron las estándar para el equipo AB7900HT en placas de 384 pocillos (incubación durante 2 min a 50 °C y 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de

15 seg a 95 °C y 1 min a 60 °C). Se utilizó la sonda GUSB de ratón (Life Technologies) como sistema de normalización. Las reacciones de PCR a tiempo real se realizaron por triplicado.

NOMBRE DE LA SONDA	GEN	TRÁNSCRITO DE REFERENCIA	EXONES
Mm01240348_m1	<i>mapt</i>	NM-001038609.1	1 a 2
Mm01246063_m1	<i>mapt</i>	NM-001038609.1	2 a 3
Mm00521990_m1	<i>mapt</i>	NM-001038609.1	8 a 9

Tabla 4. Sondas utilizadas para la detección del mRNA del gen de la proteína Tau (sondas TaqMan® de Life Technologies). Se detallan los exones con los que hibridan tomando como referencia el transcrito NM-001038609.1, que corresponde a la isoforma más larga de la proteína Tau murina.

2.9.3. Preparación de extractos proteicos

Los extractos totales de proteína procedentes del tejido cerebral (ver apartado 2.7) se homogeneizaron en Rippa Buffer compuesto por Tris-HCl 50mM pH 7,4, NP-40 1%, NaCl 150mM, EDTA (*ethylenediaminetetraacetic acid*; ácido etilendiaminotetraacético) 1mM, deoxicolato sódico 0,25%, inhibidores de fosfatasa (NaF 1mM, Na₃VO₄ 1mM y ácido okadaico 1μM) y una mezcla de inhibidores de proteasas COMPLETE™ (Roche). Posteriormente se centrifugaron los extractos a 3000 rpm durante 5 minutos y se determinó la concentración proteica de los sobrenadantes con el kit Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific).

2.9.4. Electroforesis, electrotransferencia e inmunodetección (Western Blot)

Los extractos proteicos se hirvieron durante 5 minutos en tampón de carga de electroforesis compuesto por Tris-HCl 62,5mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, EDTA 7,5mM y azul de bromofenol 0,004%. Las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida (al 8%, 10% o 15% dependiendo del peso molecular de las proteínas a analizar), en presencia de SDS y a voltaje constante. Posteriormente se procedió a la electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, Keene, NH) a amperaje constante (150mA durante 1 hora para proteínas de bajo peso molecular y 300mA durante 2 horas para proteínas de alto peso molecular) utilizando el sistema Mini-Protean de Bio-Rad. Para comprobar la eficiencia de la transferencia, las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau.

Tras la comprobación, se retiró el colorante lavando con PBS-0,1% Tween-20 (v/v) y se bloquearon las membranas con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) en PBS-0,1% Tween-20 (v/v) durante 45 minutos en agitación. Acto seguido se procedió a la incubación con el anticuerpo primario (ver **Tabla 2**) diluido en PBS-0,1% Tween-20 (v/v) toda la noche a 4°C, también en

agitación. Al día siguiente las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos con PBS-0,1% Tween-20 (v/v). Para la inmunodetección se usaron anticuerpos secundarios acoplados a HRP diluidos en PBS-0,1% Tween-20 (v/v) (ver apartado 1.1). Las membranas fueron incubadas durante 45 minutos en agitación con los anticuerpos secundarios para posteriormente ser lavadas 3 veces durante 10 minutos con PBS-0,1% Tween-20 (v/v). Las proteínas reconocidas por los anticuerpos fueron visualizadas utilizando el sistema ECL (Enhanced Chemiluminescence Detection System) de Amersham y el ImageQuant LAS 4000 mini de GE Healthcare Life Sciences. La cuantificación de las bandas obtenidas se llevó a cabo con el software Quantity One de BioRad.

2.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el programa SPSS Statistics 22 (SPSS, 1989; Apache Software Foundation, Chicago, IL, USA). Los gráficos representan los valores medios \pm S.E.M. (*standard error of the mean*). Antes de proceder a la comparación de medias se analizó la normalidad de los datos aplicando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Asimismo, se analizó la presencia de datos atípicos mediante diagramas de cajas y se eliminaron cuando fue necesario.

Para las comparaciones entre dos grupos experimentales se aplicó la prueba de la *t* de Student, en caso de cumplirse el criterio de normalidad, o la prueba no paramétrica de la U de Mann-Whitney, en el caso de datos no normales.

Para las comparaciones entre más de dos grupos experimentales se aplicaron los test de análisis de la varianza (ANOVA) de una vía o de dos vías dependiendo del número de factores implicados. Tras el ANOVA se aplicó la prueba post hoc DMS para las comparaciones dos a dos.

En el caso del análisis de variables cualitativas, como las colocalizaciones, se aplicó el test no paramétrico de la Chi-cuadrado (χ^2) de Pearson.

En todos los casos el nivel de significación aceptado fue de p -valor $< 0,05$.

RESULTADOS

1. Caracterización de la neurogénesis hipocampal adulta en condiciones basales en un modelo murino deficiente en la proteína Tau (ratones Tau^{-/-})

Como se detalla en la Introducción, datos previos de éste y otros laboratorios apuntan a que la proteína Tau podría estar implicada en la formación de nuevas neuronas durante la vida adulta. Aunque se sabe que este proceso tiene lugar en diferentes regiones del cerebro, este nuevo papel de Tau resultaría especialmente interesante en el caso del hipocampo por su relación con tauopatías como la enfermedad de Alzheimer.

Así pues, con el propósito de profundizar en el estudio de este nuevo papel de Tau, el primer objetivo de esta tesis fue caracterizar la neurogénesis hipocampal adulta en un modelo murino deficiente en esta proteína.

1.1. Comprobación de la ausencia de proteína Tau en el modelo

Como se ha comentado anteriormente, existen diferentes modelos murinos deficientes en la proteína Tau (Harada *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 2001; Tucker *et al.*, 2001; Fujio *et al.*, 2007). En este trabajo se utilizó el modelo de Dawson y colaboradores, en el cual el exón 1 del gen *mapt* se encuentra sustituido por un cassette de resistencia a neomicina. Estos ratones son viables y no presentan alteraciones evidentes, aunque sí se ha detectado en ellos un retraso en la maduración neuronal durante el desarrollo embrionario (Dawson *et al.*, 2001).

El exón 1 del gen *mapt* contiene la señal de inicio de la traducción, con lo cual su ausencia en los dos alelos del gen (ratones Tau^{-/-}) debería impedir totalmente la generación de mRNAs de la proteína. Para comprobarlo se analizaron mediante qRT-PCR los niveles de transcripción de Tau en ratones Tau^{-/-} en relación a ratones WT. Con el objetivo de descartar la existencia de secuencias promotoras adicionales en otras regiones del gen se utilizaron tres sondas diferentes que hibridan con distintas regiones del transcrito NM-001038609.1, que corresponde a la isoforma más larga de la proteína Tau murina (la que contiene todos los exones) (ver apartado 2.9.2 de Material y Métodos).

Como se esperaba, la cantidad de mRNA detectado con las sondas S1 y S2, que hibridan entre los exones 1-2 y 2-3, respectivamente, fue despreciable. Sin embargo, se detectó alrededor de un 20% de mRNA en relación al WT con la sonda S3, que hibrida entre los exones 8-9 (Figura 12).

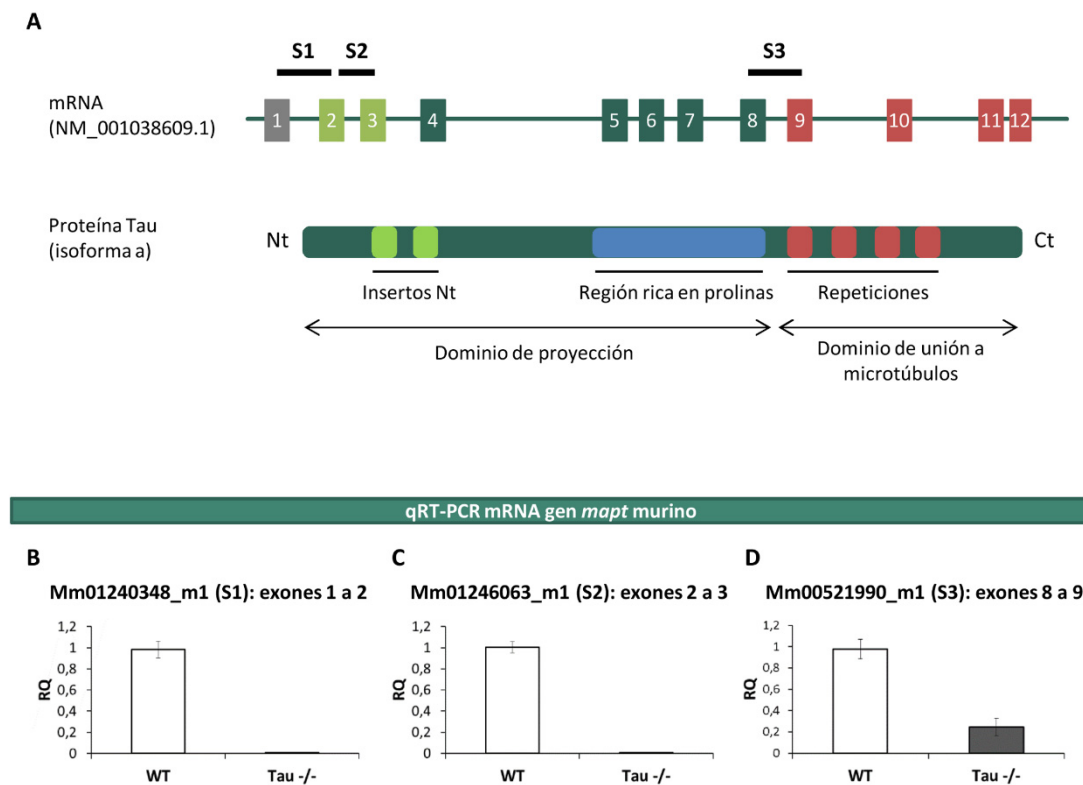


Figura 12. PCR cuantitativa del mRNA de Tau en el hipocampo de ratones Tau^{-/-}. (A) Esquema del mRNA que codifica la isoforma más larga de la proteína Tau murina. Las barras negras indican las zonas donde hibridan las sondas S1, S2 y S3 utilizadas en la qRT-PCR. (B-D) Análisis de los niveles de expresión de los fragmentos amplificados con cada sonda en los ratones Tau^{-/-} en relación a los WT (n=3 ratones/genotipo). Los valores se normalizaron en cada caso utilizando como gen control el de la β -glucuronidasa.

Dado que la presencia de esos fragmentos de mRNA de Tau no significa necesariamente su traducción a proteína, se analizó mediante WB la presencia de proteína Tau en el hipocampo de ratones Tau^{-/-}. Con el objetivo de descartar la presencia de cualquier fragmento o isoforma de Tau se utilizaron diferentes anticuerpos que reconocen epítomos distribuidos a lo largo de toda la proteína: Tau5 reconoce la región central de la proteína, Tau7.51 reconoce la región de unión a microtúbulos, Tau3R reconoce la isoforma con 3 repeticiones en el dominio de unión a microtúbulos (mayoritaria en neuronas murinas en desarrollo), y Tau4R reconoce la isoforma con 4 repeticiones (mayoritaria en neuronas murinas maduras). Como se aprecia en la **Figura 13 A-D**, no se detectó proteína Tau con ninguno de estos anticuerpos.

Puesto que la isoforma mayoritaria de Tau en las neuronas en desarrollo, que son las que nos ocupan, es la Tau3R, se comprobó también mediante inmunofluorescencia su ausencia en las nuevas neuronas del DG del hipocampo (**Figura 13 E-H**). En los animales WT se observa que la proteína Tau3R colocaliza parcialmente con la proteína calretinina, que marca una subpoblación de neuronas en desarrollo procedentes de neurogénesis adulta. En los animales

Tau^{-/-} se observan neuronas marcadas con calretinina pero no con Tau3R, indicando que en estos animales no se está expresando Tau en las nuevas neuronas del DG.

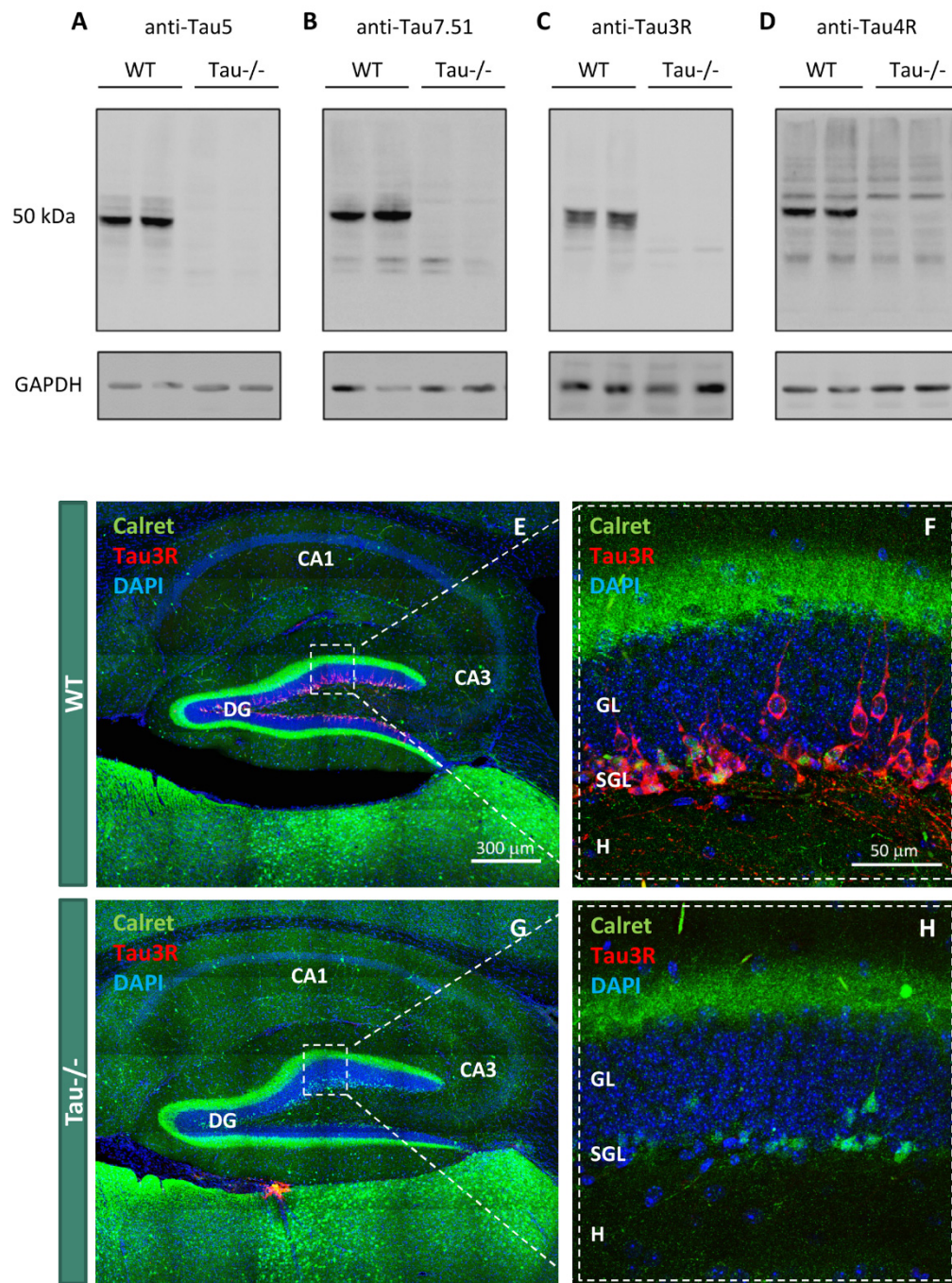


Figura 13. Análisis de la expresión de la proteína Tau en el hipocampo de ratones Tau^{-/-}. (A-D) Western Blot representativo de la expresión de Tau con los anticuerpos Tau5 (A), Tau7.51 (B), Tau3R (C) y Tau4R (D) en el hipocampo de ratones WT y Tau^{-/-}. En todos los casos se utilizó GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) como control de carga. En los ratones Tau^{-/-} no se observa expresión de Tau con ninguno de los anticuerpos utilizados. (E-H) Inmunofluorescencia doble en cortes sagitales de hipocampo de ratones WT (E,F) y Tau^{-/-} (G,H) con los anticuerpos calretinina (calret) (verde) y Tau3R (rojo), que marcan neuronas inmaduras en desarrollo. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). En los ratones Tau^{-/-} no se observan neuronas marcadas con el anticuerpo Tau3R. Los recuadros blancos en E y G señalan las regiones dónde se han obtenido las imágenes aumentadas del giro dentado en F y H. Barras de escala 300 μm (E-G) y 50 μm (F-H). GL: capa granular. SGL: capa subgranular. H: hilus.

1.2. La ausencia de Tau no provoca alteraciones en la proliferación, muerte ni supervivencia de las nuevas neuronas generadas en el DG

Una vez comprobado que los ratones Tau^{-/-} no expresan Tau, se procedió con el estudio del efecto de su ausencia en el proceso de generación de nuevas neuronas en el hipocampo adulto.

Las nuevas neuronas se generan a partir de la proliferación de precursores existentes en la SGL y se van diferenciando hasta convertirse en neuronas granulares maduras e integrarse en el circuito hipocampal. Sin embargo, no todas las células que se dividen llegan a convertirse en neuronas maduras, ya que muchas de ellas no se seleccionan y mueren durante la diferenciación (Toni y Sultan, 2011).

Puesto que se trata de un proceso dinámico en el que continuamente se están generando y muriendo nuevas células, se analizaron en primer lugar los parámetros generales de proliferación y muerte celular.

La tasa de proliferación celular se cuantificó mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo que reconoce la proteína PH3, que marca células que se encuentran en la fase M de la mitosis. El análisis se llevó a cabo en animales de 4 meses de edad (**Figura 8, grupo A**) como se detalla en el apartado 2.8.3 de Material y Métodos. Los resultados obtenidos muestran que no hay diferencias en la tasa de proliferación celular en el DG de los ratones WT y Tau^{-/-} (WT= 65 ± 2 ; Tau^{-/-}= 59 ± 8 células totales en el DG) (**Figura 14 A-B**).

La tasa de muerte se cuantificó de la misma manera y en los mismos animales que la tasa de proliferación. En este caso se utilizó el marcador fractina, que marca células que presentan un fragmento escindido de actina que aparece durante la apoptosis. En este caso tampoco se encontraron diferencias entre los animales WT y los Tau^{-/-} (WT= 178 ± 10 ; Tau^{-/-}= 194 ± 20 células totales en el DG) (**Figura 14 C-D**).

Puesto que la proliferación y la muerte celular son parámetros generales que podrían no reflejar cambios en subpoblaciones concretas de células, se analizó la supervivencia a distintas edades de grupos discretos de nuevas neuronas utilizando un marcaje *in vivo* con análogos de timidina (ver apartado 2.2 de Material y Métodos).

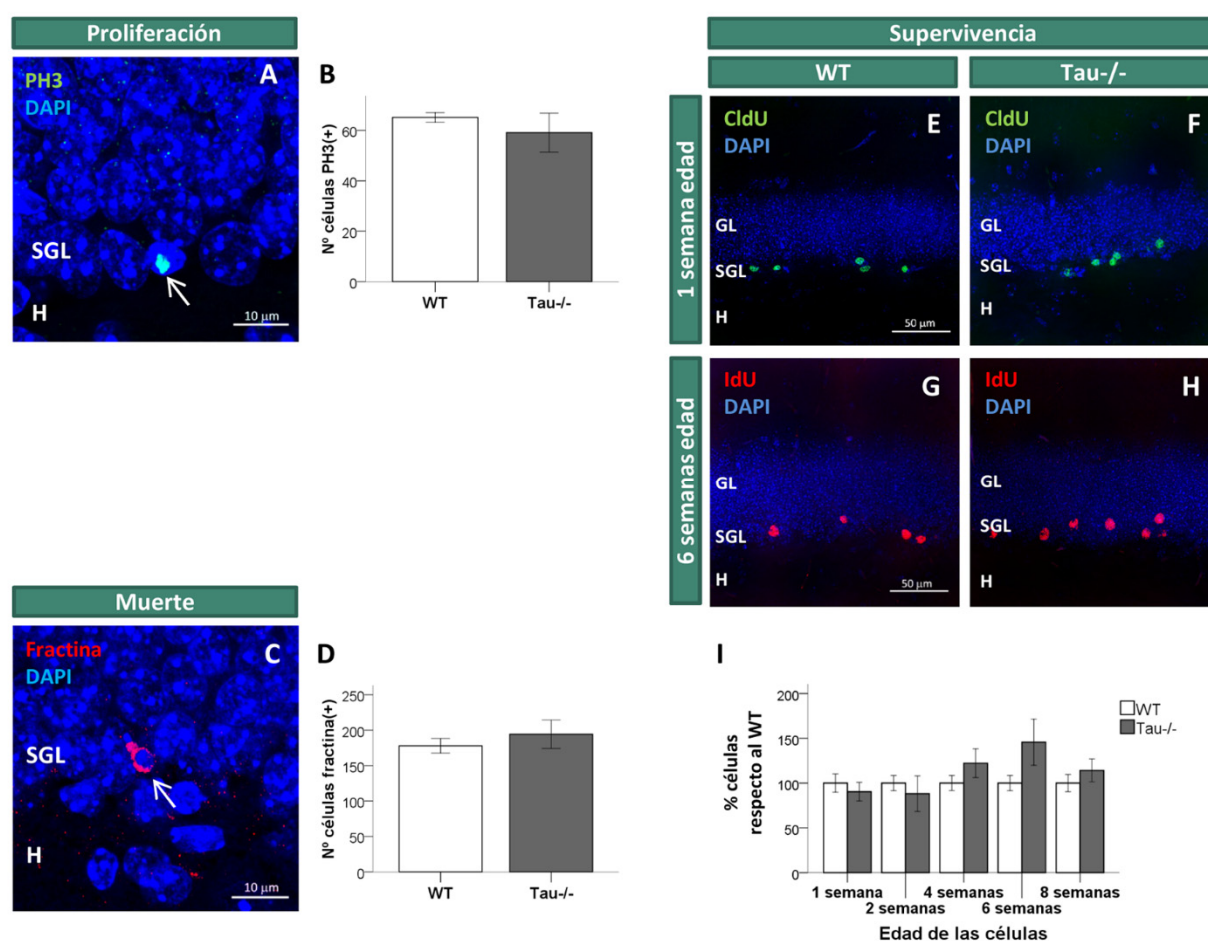


Figura 14. Análisis de la proliferación, muerte y supervivencia de las nuevas neuronas generadas en el DG de ratones WT y Tau^{-/-}. Todas las cuantificaciones se realizaron mediante inmunofluorescencia (IF) en secciones sagitales del hipocampo de ratones WT y Tau^{-/-}. **(A)** Imagen representativa de la IF del marcador de proliferación PH3 (verde). Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). Barra de escala 10 μ m. **(B)** Representación gráfica de la tasa de proliferación en ratones WT y Tau^{-/-} expresada como n° de células totales en división en el DG. **(C)** Imagen representativa de la IF del marcador de apoptosis fractina (rojo). Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). Barra de escala 10 μ m. **(D)** Representación gráfica de la cuantificación de la tasa de muerte celular expresada como n° de células apoptóticas totales en el DG. **(E-H)** Imágenes representativas de la IF de células de 1 semana de edad, marcadas con CldU (verde), y de 6 semanas de edad, marcadas con IdU (rojo). Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). Barras de escala 50 μ m. **(I)** Representación gráfica de la cuantificación de la tasa de supervivencia de las células de 1, 2, 4, 6 y 8 semanas de edad, expresada como % de células en los animales Tau^{-/-} respecto a los WT en cada punto temporal. No se han encontrado diferencias significativas ni en la proliferación, ni en la muerte, ni en la supervivencia de las nuevas neuronas generadas en el DG de los ratones Tau^{-/-} respecto a los WT. Las flechas blancas señalan células positivas para PH3 y fractina, respectivamente. GL= capa granular, SGL=capa subgranular, H=hilus.

Se administraron los análogos de timidina IdU y CldU a los grupos de animales A, B y C según se muestra en la **Figura 8**, de tal manera que fue posible analizar la supervivencia de células de 1, 2, 4, 6 y 8 semanas de edad. El análisis se llevó a cabo como se detalla en el apartado 2.8.3 de Material y Métodos.

Se ha demostrado que la distinta sensibilidad de los anticuerpos que reconocen IdU y CldU no permite comparar los números absolutos de las células marcadas con cada análogo

(Leuner *et al.*, 2009). Así pues, los resultados se presentan como porcentaje de células respecto a la media de los WT en cada punto temporal. Como se muestra en la **Figura 14 E-I**, no se han encontrado diferencias significativas en la supervivencia de las células en ninguno de los puntos temporales estudiados, aunque sí se aprecia un leve aumento en el número de células de 4 y 6 semanas de edad en los Tau^{-/-} respecto a los WT.

1.3. La ausencia de Tau no provoca alteraciones en la diferenciación de las nuevas neuronas generadas en el DG

Una vez descartadas las diferencias en los niveles de proliferación, muerte y supervivencia celular, se procedió a estudiar si la ausencia de Tau tenía algún efecto en la diferenciación de las nuevas neuronas generadas en el DG.

Desde que los progenitores neuronales se dividen hasta que la nueva célula presenta todas las características de una neurona madura, ésta pasa por diferentes estadios de diferenciación que pueden ser identificados por la expresión selectiva de diferentes marcadores (**Figura 15 A**). Alteraciones en el número de células que expresan estos marcadores podrían estar evidenciando alteraciones en el encendido o apagado de los mismos, lo cual a su vez indicaría un proceso anormal de diferenciación.

En primer lugar se analizó mediante inmunofluorescencia el número de progenitores neuronales utilizando los marcadores Sox2 y BLBP. Al igual que en el apartado 1.2, el estudio se llevó a cabo en animales de 4 meses de edad (**Figura 8, grupo A**). Para cada uno de estos marcadores se cuantificó el número total de células positivas en la SGL de cada animal como se describe en el apartado 2.8.3 de Material y Métodos. Los resultados mostraron ausencia de diferencias significativas tanto en el número de células positivas para Sox2 (WT= 41943 ± 4759; Tau^{-/-}= 50925 ± 6101 células) (**Figura 15 F**), como en el número de células positivas para BLBP (WT=29230 ± 3727; Tau^{-/-}=35133 ± 4519 células) (**Figura 15 G**).

A continuación se analizó, en los mismos animales y utilizando las mismas técnicas, el número de neuroblastos y de neuronas inmaduras utilizando los marcadores DCX y calretinina. Tampoco en estos análisis se encontraron diferencias significativas ni en el número de células positivas para DCX (WT= 43717 ± 4187; Tau^{-/-}= 51330 ± 4732 células) (**Figura 15 K**), ni en el número de células positivas para calretinina (WT= 40862 ± 4291; Tau^{-/-}= 50300 ± 5060 células) (**Figura 15 L**).

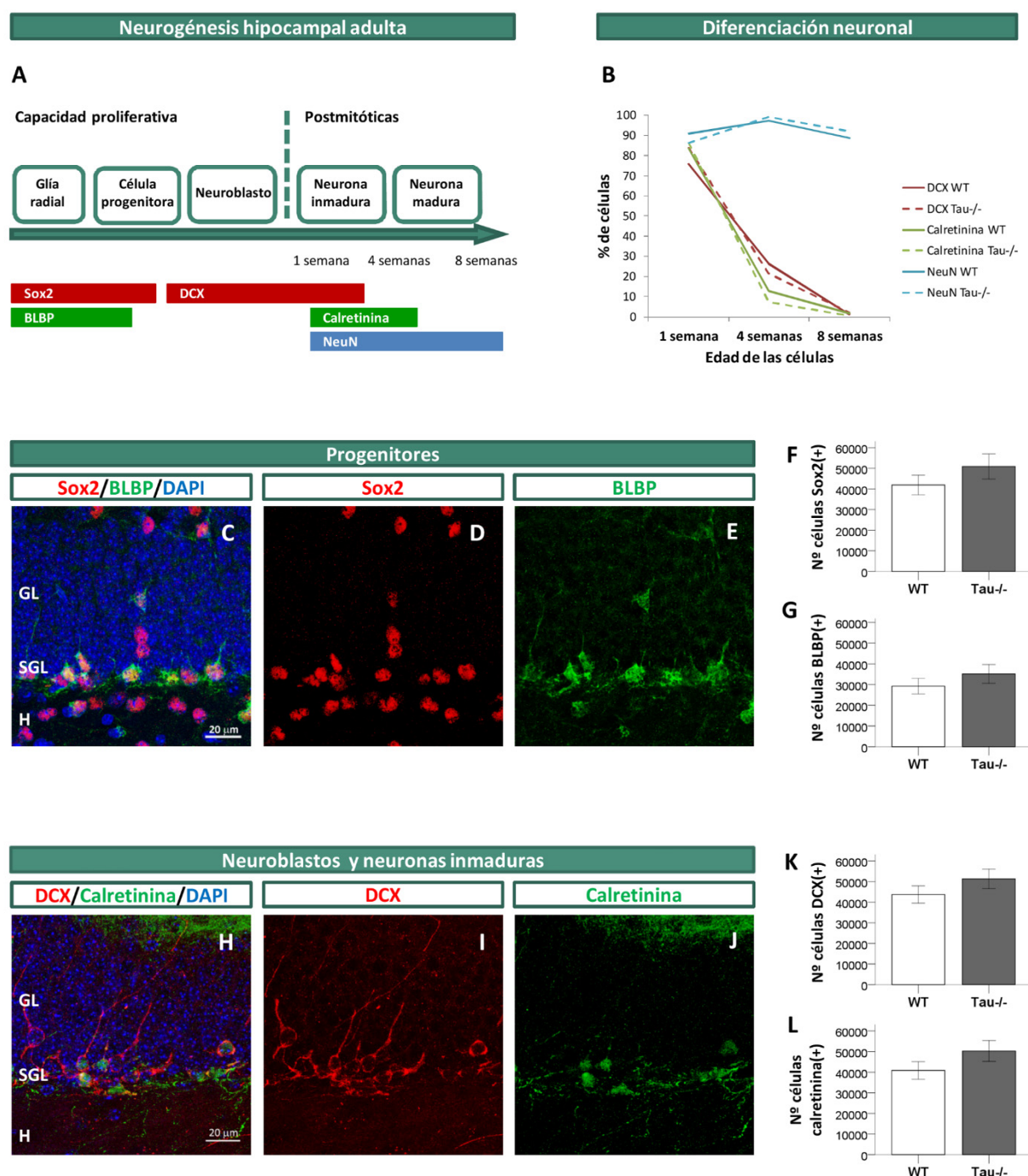


Figura 15. Análisis de la diferenciación de las nuevas neuronas generadas en el DG de ratones WT y Tau^{-/-}. Todas las cuantificaciones se realizaron mediante inmunofluorescencia (IF) en secciones sagitales del hipocampo de ratones WT y Tau^{-/-}. **(A)** Esquema representativo de la expresión de diferentes marcadores celulares durante el proceso de neurogénesis hipocampal adulta. **(B)** Representación gráfica de los porcentajes de colocación de los análogos de timidina con los marcadores de diferenciación neuronal DCX, calretinina y NeuN en células de 1, 4 y 8 semanas de edad. Los resultados se muestran como % de células dobles para el análogo y el marcador correspondiente. **(C-E)** Imágenes representativas de la IF de progenitores neuronales marcados con Sox2 (rojo) y BLBP (verde). Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). Barra de escala 20 µm. No se han encontrado diferencias significativas entre los ratones WT y los Tau^{-/-} ni en el nº total de células Sox2 positivas **(F)** ni en el de células BLBP positivas **(G)**. **(H-J)** Imágenes representativas de la IF de neuroblastos y neuronas inmaduras marcadas con DCX (rojo) y calretinina (verde). Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). Barra de escala 20 µm. No se han encontrado diferencias significativas entre los ratones WT y los Tau^{-/-} ni en el nº total de células DCX positivas **(K)** ni en el de células calretinina positivas **(L)**. GL= capa granular, SGL=capa subgranular, H=hilus.

A la vista de estos resultados, podría concluirse que no parece haber diferencias en el proceso de diferenciación neuronal debidas a la ausencia de Tau. Sin embargo, podría ocurrir que la secuencia de diferenciación no tuviese lugar en la edad celular adecuada (**Figura 15 A**). Para comprobarlo, se analizó el porcentaje de células de 1, 4 y 8 semanas de edad (marcadas con análogos de timidina) que expresaban los marcadores DCX, calretinina y NeuN. El análisis se llevó a cabo en animales de 4 meses de edad (**Figura 8, grupos A y C**) como se describe en el apartado 2.8.4 de Material y Métodos. Como se muestra en la **Figura 15 B**, no se encontraron diferencias significativas entre los ratones WT y los Tau^{-/-} en los porcentajes de colocación de los análogos de timidina con ninguno de los marcadores de diferenciación a ninguna de las edades celulares estudiadas.

Así pues, se puede concluir que la ausencia de Tau no provoca alteraciones ni en la secuencia de diferenciación neuronal ni en los momentos en la que ésta tiene lugar a lo largo de la vida de la neurona.

1.4. La ausencia de Tau produce alteraciones en la maduración morfológica de las nuevas neuronas generadas en el DG

Otro de los pasos más importantes en el desarrollo de las nuevas neuronas es su maduración e integración en circuito trisináptico del hipocampo. Para evaluar el efecto de la ausencia de Tau en este proceso se marcaron las nuevas neuronas infectándolas *in vivo* con retrovirus PSD95-GFP como se describe en el apartado 2.3 de Material y Métodos.

El estudio se llevó a cabo en animales de entre 3 y 4 meses de edad. En ellos se analizaron las características morfológicas de neuronas de 4 (en proceso de maduración) (**Figura 8, grupo D**) y de 8 semanas de edad (neuronas maduras) (**Figura 8, grupo E**).

1.4.1. Las nuevas neuronas producidas en el DG de los ratones Tau^{-/-} presentan retraso en la dendritogénesis

El análisis morfométrico de la longitud y la ramificación dendrítica de las neuronas marcadas con los retrovirus PSD95-GFP se llevó a cabo como se detalla en el apartado 2.8.5.1 de Material y Métodos. En primer lugar se cuantificó la longitud dendrítica total de las neuronas de 4 semanas de edad, que resultó ser significativamente menor en los animales Tau^{-/-} en comparación con los ratones WT (WT= $790,5 \pm 26,7 \mu\text{m}$; Tau^{-/-}= $611,6 \pm 24,3 \mu\text{m}$) ($p < 0,001$) (**Figura 16 E**). A continuación se analizó la ramificación del árbol dendrítico mediante el análisis de Sholl, que consiste la cuantificación del número de intersecciones del árbol dendrítico con una serie de círculos concéntricos trazados a partir del soma de la neurona y que se encuentran

separados entre sí por intervalos constantes (**Figura 16 A**). Como se muestra en la **Figura 16 G**, las neuronas de 4 semanas de edad de los ratones *Tau*^{-/-} presentan una ramificación dendrítica significativamente menor a la de los ratones WT en los tramos comprendidos entre las 100 y las 150 (WT= $22,2 \pm 1,1$; *Tau*^{-/-}= $18,7 \pm 0,9$ intersecciones) ($p = 0,020$), entre las 150 y las 200 (WT= $14,8 \pm 1,3$; *Tau*^{-/-}= $5,9 \pm 0,7$ intersecciones) ($p < 0,001$) y entre las 200 y las 250 μm de distancia al soma (WT= $3,0 \pm 0,6$; *Tau*^{-/-}= $1,9 \pm 0,5$ intersecciones) ($p = 0,037$). En el tramo más distal, no obstante, la ramificación en los animales *Tau*^{-/-} es ligeramente superior a la de los WT (WT= $0,29 \pm 0,20$; *Tau*^{-/-}= $2,31 \pm 0,62$ intersecciones) ($p = 0,008$).

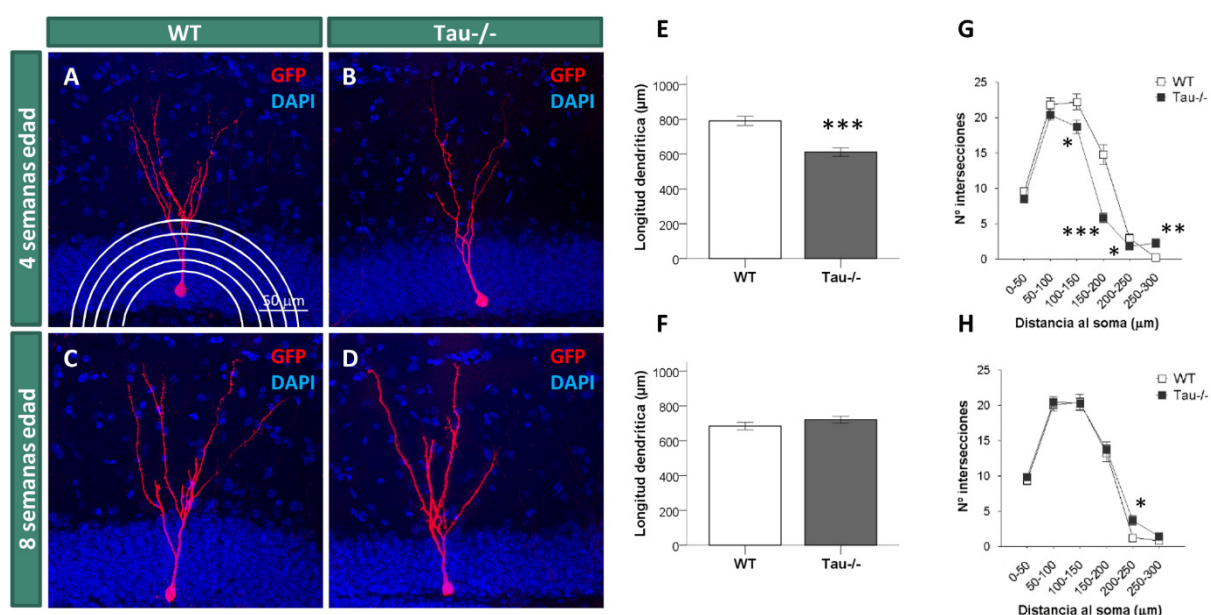


Figura 16. Análisis morfométrico del árbol dendrítico de las nuevas neuronas generadas en el DG de ratones WT y *Tau*^{-/-}. (A-D) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de neuronas de 4 semanas de edad (A-B) y de 8 semanas de edad (C-D) en secciones sagitales de hipocampo de animales inyectados con retrovirus PSD95-GFP. La proteína GFP aparece en rojo y los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). Barra de escala 50 μm . En (A) se muestra una representación esquemática de las circunferencias concéntricas empleadas para el análisis de Sholl. (E-F) Representaciones gráficas de los análisis de longitud dendrítica de neuronas de 4 (E) y 8 semanas de edad (F). La longitud dendrítica de las neuronas de 4 semanas de edad de los animales *Tau*^{-/-} es menor que la de los WT, pero en las neuronas de 8 semanas de edad las diferencias desaparecen. (G-H) Representaciones gráficas de los análisis de ramificación dendrítica (análisis de Sholl), expresados como n° de intersecciones en función de la distancia al soma, en neuronas de 4 (G) y 8 semanas de edad (H). Las neuronas de 4 semanas de edad de los animales *Tau*^{-/-} presentan en general una ramificación dendrítica inferior a la de los WT, pero en las neuronas de 8 semanas de edad estas diferencias desaparecen. Los asteriscos indican diferencias significativas: *0,05 > p ≥ 0,01; **0,01 > p ≥ 0,001; ***p < 0,001.

Una vez estudiadas las neuronas de 4 semanas de edad, se procedió a efectuar los mismos análisis en neuronas ya maduras de 8 semanas de edad. Los resultados mostraron que a esta edad desaparecen las diferencias en los valores de longitud dendrítica total debidas a la ausencia de Tau (WT= $684,0 \pm 21,7$; *Tau*^{-/-}= $720,7 \pm 19,0 \mu\text{m}$) ($p = 0,210$) (**Figura 16 F**). Asimismo, el análisis de Sholl tampoco reveló a grandes rasgos la existencia de diferencias en la ramificación

de las dendritas en los animales Tau^{-/-} respecto a los WT, a excepción de un ligero aumento en el tramo comprendido entre las 200 y las 250 μm de distancia al soma (WT= $1,29 \pm 0,30$; Tau^{-/-}= $3,74 \pm 0,68$ intersecciones) ($p= 0,014$) (**Figura 16 H**).

Así pues, de todo lo anterior puede concluirse que la ausencia de Tau provoca un retraso en la elongación y la ramificación de las dendritas a las 4 semanas de edad que se normaliza a las 8 semanas de edad, cuando la neurona ya ha completado su maduración morfológica.

1.4.2. La ausencia de Tau provoca alteraciones en el número y en el tamaño de las PSDs de las nuevas neuronas generadas en el DG

Puesto que la ausencia de Tau provocaba un retraso en la dendritogénesis de las nuevas neuronas, y dado que la integración funcional de las mismas en el circuito hipocampal requiere la formación de sinapsis con las aferencias provenientes de la corteza entorrinal, procedimos a estudiar el proceso de formación y mantenimiento de estas sinapsis. Los análisis del número y el tamaño de las PSDs de las nuevas neuronas marcadas con los retrovirus PSD95-GFP se llevaron a cabo de manera independiente para cada orden de ramificación dendrítica como se detalla en el apartado 2.8.5.2 de Material y Métodos.

Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas en el número de PSDs en las neuronas de 4 semanas de edad de los ratones Tau^{-/-} respecto a los ratones WT (**Figura 17 I**). Sí existen, sin embargo, diferencias en cuanto a su tamaño, siendo más grandes las PSDs de los Tau^{-/-} en las dendritas de 2º (WT= $0,04 \pm 0,002$; Tau^{-/-}= $0,09 \pm 0,010 \mu\text{m}^2$) ($p<0,001$) y 4º orden de ramificación (WT= $0,10 \pm 0,004$; Tau^{-/-}= $0,12 \pm 0,006 \mu\text{m}^2$) ($p<0,001$) en comparación con las de los ratones WT (**Figura 17 J**).

En neuronas maduras de 8 semanas de edad tan sólo existen diferencias significativas en el número de PSDs en las dendritas de 5º orden, en las que este número es significativamente menor en los Tau^{-/-} respecto a los ratones WT (WT= $1,7 \pm 0,12$; Tau^{-/-}= $1,3 \pm 0,09$ PSDs/ μm) ($p= 0,047$) (**Figura 17 K**). Además, las PSDs de estas dendritas de 5º orden son de menor tamaño que las de los WT (WT= $0,15 \pm 0,008$; Tau^{-/-}= $0,13 \pm 0,007 \mu\text{m}^2$) ($p<0,001$), mientras que en los demás órdenes de ramificación las PSDs son más grandes en los ratones Tau^{-/-} que en los WT (dendritas de 2º orden: WT= $0,08 \pm 0,008$; Tau^{-/-}= $0,11 \pm 0,014 \mu\text{m}^2$; $p= 0,069$; dendritas de 3º orden: WT= $0,12 \pm 0,008$; Tau^{-/-}= $0,14 \pm 0,010 \mu\text{m}^2$; $p<0,001$; dendritas de 4º orden: WT= $0,12 \pm 0,007$; Tau^{-/-}= $0,15 \pm 0,008 \mu\text{m}^2$; $p= 0,001$) (**Figura 17 L**).

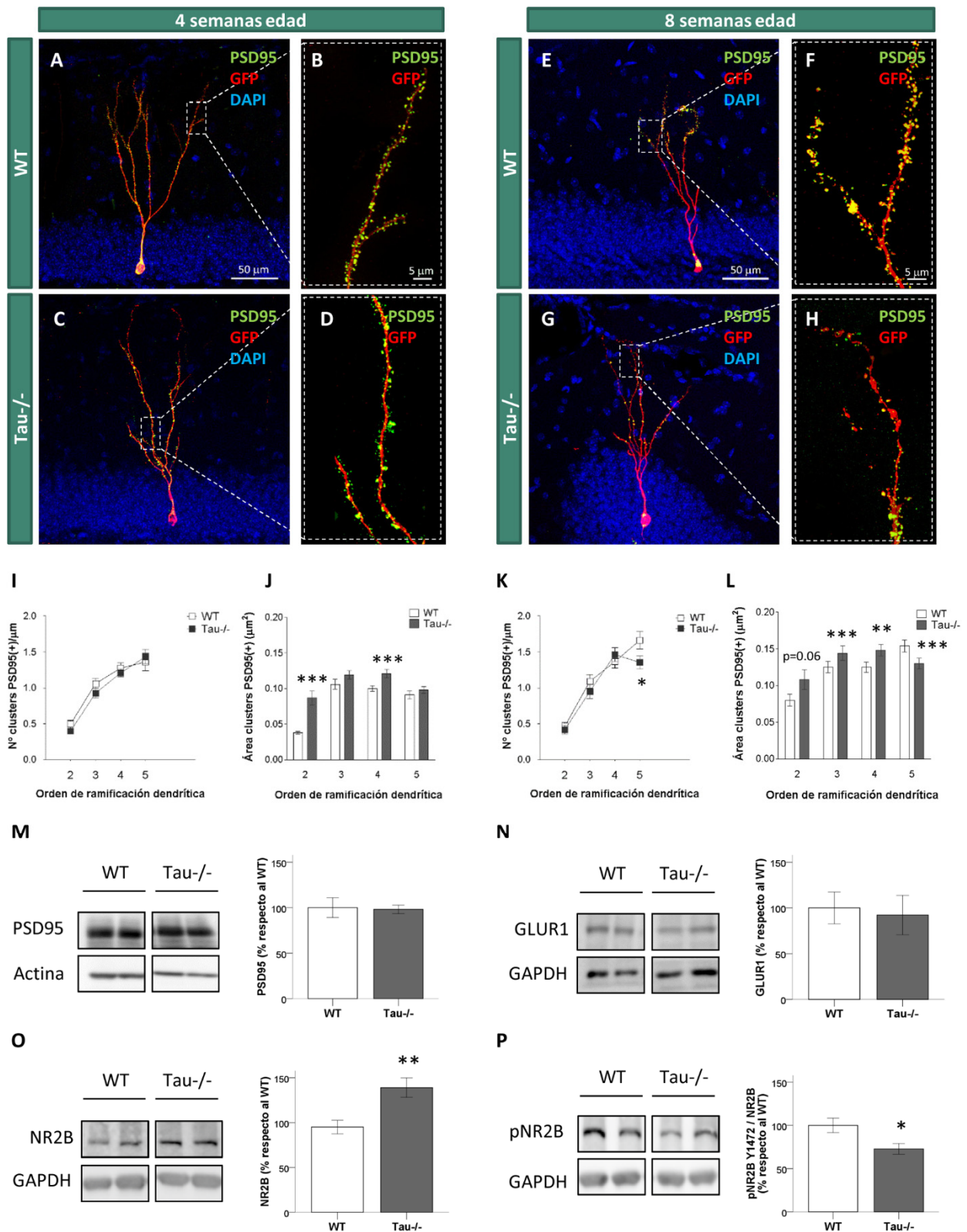


Figura 17. Efecto de la ausencia de Tau en las PSDs de las nuevas neuronas generadas en el DG. (A-H) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra GFP de neuronas de 4 **(A-D)** y 8 semanas de edad **(E-H)** infectadas con retrovirus PSD95-GFP. En verde se muestran las PSDs marcadas con PSD95, y en rojo la proteína GFP marcando la morfología neuronal. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). Los recuadros blancos punteados señalan las regiones donde se han obtenido las imágenes ampliadas. **(I-J)** Representación gráfica del n° de PSDs/ μm **(I)** y su área **(J)** a lo largo del árbol dendrítico de las neuronas de 4 semanas de edad. El área de las PSDs en las dendritas de 2º y 4º orden es mayor en los ratones Tau^{-/-} respecto a los ratones WT. **(K-L)** Representación gráfica del n° de PSDs/ μm **(K)** y su área **(L)** a lo largo del árbol dendrítico de las neuronas de 8 semanas de edad. El área de las PSDs es mayor en los ratones Tau^{-/-} en todos los órdenes de ramificación dendrítica excepto en las de 5º orden, en las que no sólo el área es menor sino que además son menos numerosos. **(M-P)** Western Blot representativos y cuantificaciones de las proteínas postsinápticas PSD95 **(M)**, GluR1 **(N)**, NR2B **(O)** y NR2B fosforilada en Y1472 **(P)** en el hipocampo de ratones WT y Tau^{-/-}. En ratones Tau^{-/-} la cantidad de NR2B se encuentra aumentada y su fosforilación en Y1472 reducida. Como control de carga se utilizaron las proteínas GAPDH o actina. Los asteriscos indican diferencias significativas: *0,05 > p ≥ 0,01; **0,01 > p ≥ 0,001; ***p < 0,001. Barras de escala 50 μm y 5 μm . GL: capa granular. SGL: capa subgranular. H: hilus.

Para comprobar si los cambios observados en la conectividad de las nuevas neuronas podrían ser extensivos a la población general de neuronas hipocámpales, se analizaron mediante WB los niveles de diferentes proteínas postsinápticas en el hipocampo de ratones WT y Tau^{-/-}. En primer lugar se analizó la cantidad de proteína PSD95, que resultó no ser diferente en los Tau^{-/-} respecto a los WT (**Figura 17 M**). A continuación se estudiaron los niveles del receptor de glutamato tipo AMPA GLUR1, no encontrándose tampoco diferencias significativas (**Figura 17 N**). Sí se observó, sin embargo, un aumento en la cantidad de la subunidad 2b del receptor de glutamato tipo NMDA (NR2B) en los animales Tau^{-/-} respecto a los WT (WT= 95,05 ± 7,54; Tau^{-/-}= 139,00 ± 10,89 % respecto a la media de los WT) (p= 0,003) (**Figura 17 O**). Se ha descrito que Tau puede desempeñar un papel en las PSDs a través de su interacción con la quinasa Fyn, encargada de fosforilar a la subunidad 2b de los receptores NMDA para facilitar su interacción con PSD95 (Ittner *et al.*, 2010). Puesto que en el hipocampo de los ratones Tau^{-/-} los niveles de NR2B estaban aumentados, se analizó su fosforilación en Y1472, que es la diana de Fyn. Los resultados mostraron que en ausencia de Tau la fosforilación de NR2B en Y1472 se encuentra significativamente reducida (WT= 100,00 ± 8,39; Tau^{-/-}= 72,83 ± 6,14 % respecto a la media de los WT) (p= 0,022) (**Figura 17 P**).

En resumen, los datos parecen indicar que la ausencia de Tau produce un aumento general en el tamaño de las PSDs en todo el árbol dendrítico de las nuevas neuronas maduras excepto en las dendritas de 5º orden, en las que las PSDs no sólo son más pequeñas que en los animales WT sino que además son menos numerosas. Por otra parte, en los animales Tau^{-/-} se produce un aumento generalizado en el hipocampo de los niveles de NR2B y una disminución en su fosforilación por Fyn.

1.4.3. La ausencia de Tau no afecta a la morfología de los axones de las nuevas neuronas generadas en el DG

A la vista de los resultados anteriores, y puesto que Tau es una proteína que juega un papel fundamental en axones, decidimos analizar también el efecto de su ausencia en las fibras musgosas de las neuronas granulares del DG adulto.

En primer lugar se analizó el área de los terminales axónicos de las nuevas neuronas infectadas con los retrovirus PSD95-GFP en CA3, su zona principal de proyección. La cuantificación se llevó a cabo como se detalla en el apartado 2.8.5.3 de Material y Métodos, no encontrándose diferencias ni en el área de los terminales de neuronas de 4 ni de 8 semanas de edad entre los animales Tau^{-/-} y los WT (**Figura 18 A-D**).

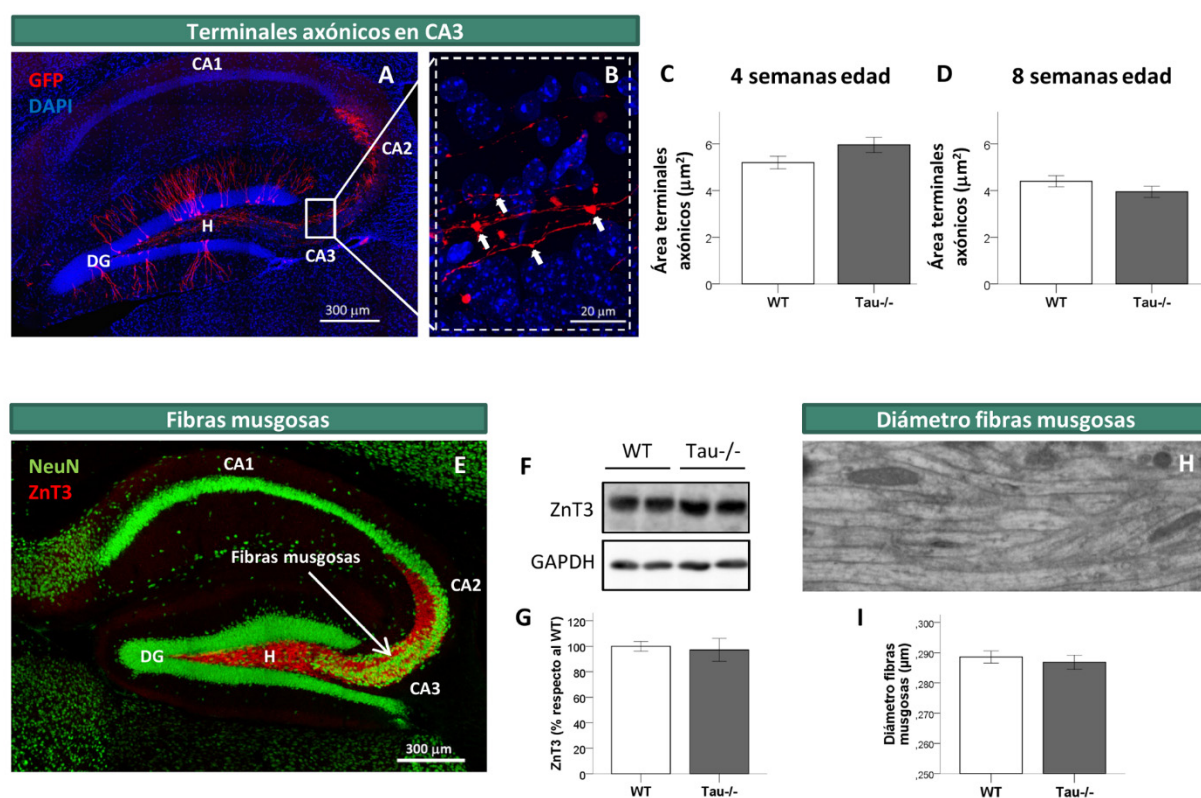


Figura 18. Efecto de la ausencia de Tau en los axones de las neuronas granulares del DG. (A-B) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia (IF) contra GFP (rojo) de neuronas infectadas con retrovirus PSD95-GFP (A) y ampliación de los terminales axónicos en CA3 (B). Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). (C-D) Cuantificación del área de los terminales axónicos en CA3 de neuronas de 4 (C) y 8 semanas de edad (D). (E) Imagen de IF de los axones de las neuronas granulares del DG (fibras musgosas) marcados con el anticuerpo anti-ZnT3 (rojo). Los somas de las neuronas aparecen marcados con NeuN (verde). (F-G) Western Blot representativo (F) y cuantificación (G) de la expresión de ZnT3 en el hipocampo de ratones Tau^{-/-} y WT. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. (H-I) Imagen representativa de microscopía electrónica (H) y cuantificación del diámetro de las fibras musgosas en CA3 en animales Tau^{-/-} y WT (I). No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables cuantificadas. Barras de escala 300 µm y 20 µm. Las flechas blancas en (B) señalan terminales axónicos.

A continuación se llevó a cabo un análisis general mediante WB de la cantidad de proteína transportadora de zinc 3 (ZnT3), que se utiliza como marcador específico de fibras musgosas (**Figura 18 E**) (Mitsuya *et al.*, 2009), en el hipocampo de ratones Tau^{-/-} y WT. Los resultados mostraron que tampoco existen diferencias en la cantidad de ZnT3 entre ambos genotipos (**Figura 18 F-G**).

Por último, con el objetivo de profundizar un poco más en el estado de los axones de las neuronas granulares, se llevó a cabo un análisis mediante microscopía electrónica de la ultraestructura de las fibras musgosas en ausencia de Tau. El estudio se llevó a cabo en ratones de 4 meses de edad siguiendo la metodología detallada en el apartado 2.8.6 de Material y Métodos. Se analizó el diámetro de las fibras musgosas, no encontrándose tampoco diferencias entre los animales Tau^{-/-} y los WT (**Figura 18 H-I**).

En resumen, de los resultados anteriores podría concluirse que la ausencia de Tau no produce cambios en los parámetros estudiados en los axones de las neuronas granulares del DG del hipocampo, procedan éstas o no de neurogénesis adulta.

1.5. La neurotransmisión aferente en la capa molecular del giro dentado presenta alteraciones en los animales Tau^{-/-}

Una vez terminada la caracterización del efecto de la ausencia de Tau sobre las neuronas procedentes de la neurogénesis hipocampal adulta, y puesto que se observaron alteraciones en sus dendritas y PSDs, decidimos estudiar la innervación aferente que conecta con estas neuronas en la capa molecular del DG. Para ello se llevó a cabo un análisis mediante inmunofluorescencia del área ocupada por terminales glutamatérgicos (vGLUT-1) y GABAérgicos (GAD-65), que constituyen la innervación mayoritaria de las neuronas granulares del giro dentado, en 3 subregiones diferentes de la capa molecular: capa molecular interna (IML), media (MML) y externa (EML) (**Figura 19 A-L**).

La cuantificación se llevó a cabo en animales de 4 meses de edad (**Figura 8, grupo A**) como se detalla en el apartado 2.8.4 de Material y Métodos. Los resultados mostraron que en ausencia de Tau se produce un aumento de innervación glutamatérgica en la MML (WT= $37,85 \pm 0,57$; Tau^{-/-}= $43,21 \pm 1,49$ % área ocupada) ($p= 0,024$) (**Figura 19 M-O**). La innervación GABAérgica, por su parte, resultó ser también mayor tanto en la MML (WT= $34,41 \pm 0,13$; Tau^{-/-}= $37,73 \pm 0,75$ % área ocupada) ($p= 0,001$) como en la EML (WT= $24,86 \pm 0,05$; Tau^{-/-}= $27,67 \pm 0,56$ % área ocupada) ($p<0,001$) de los animales Tau^{-/-} (**Figura 19 P-R**).

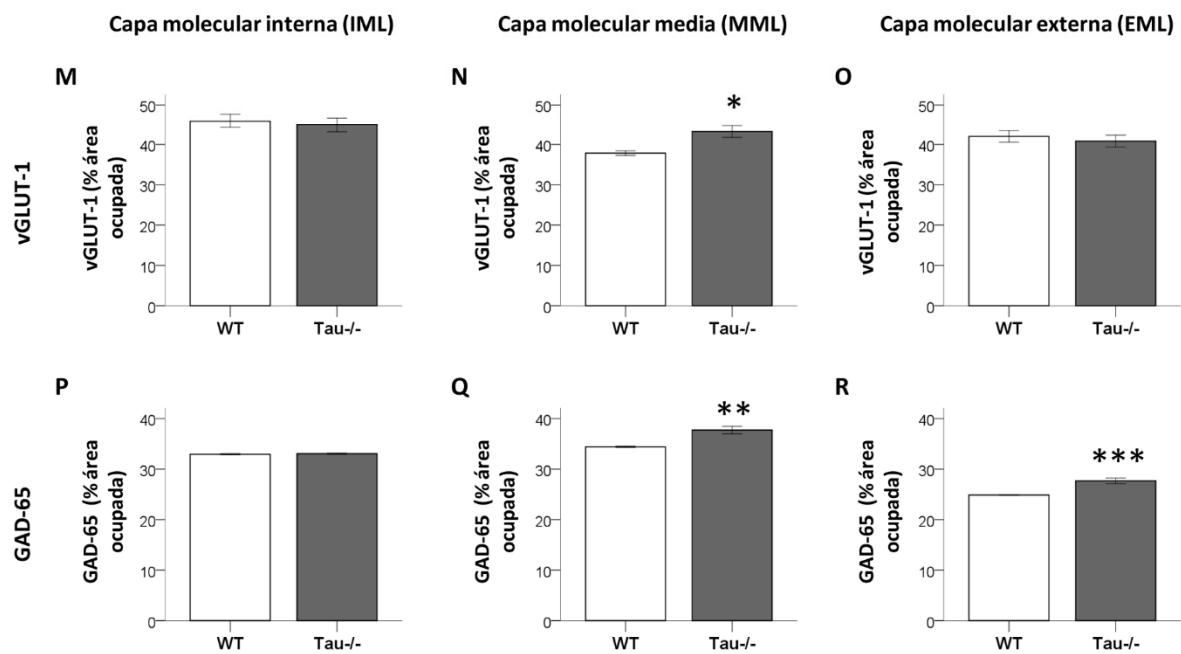
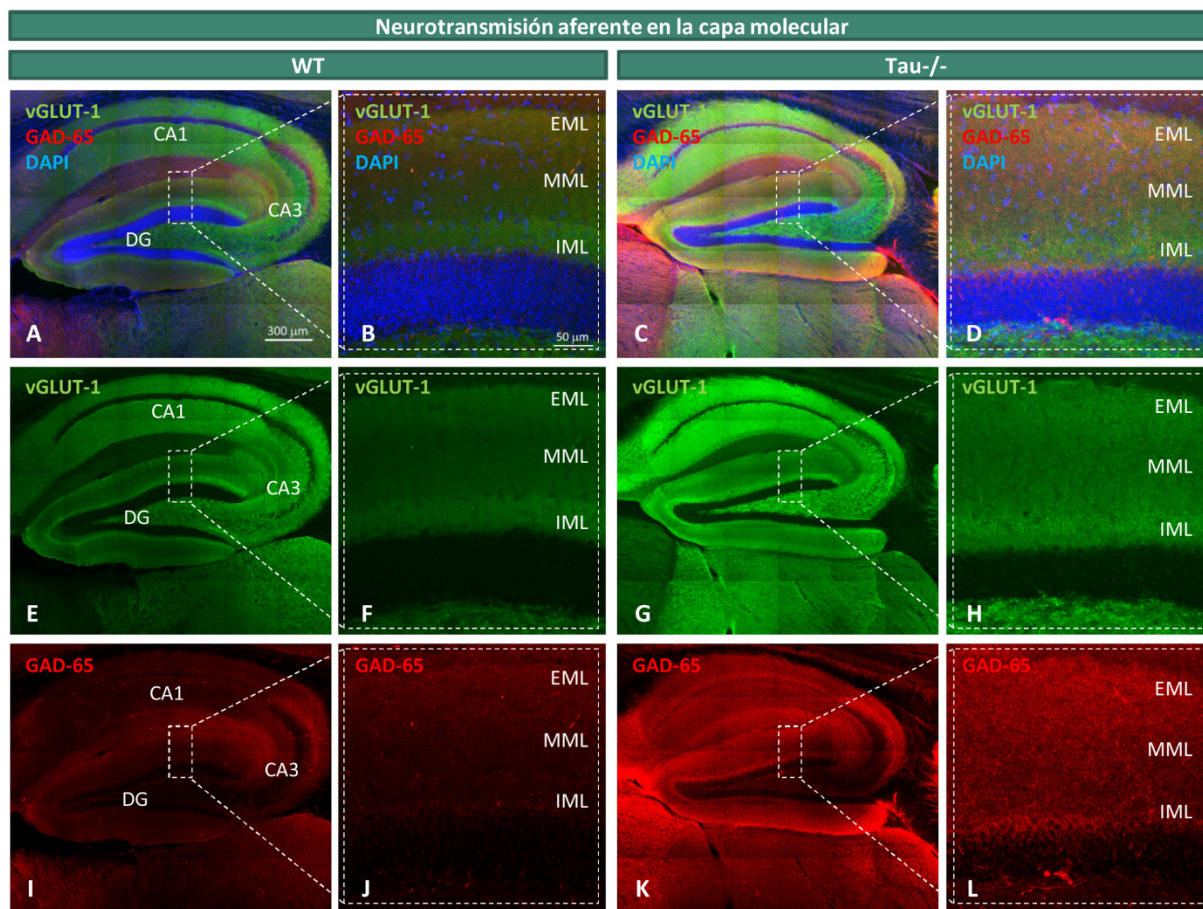


Figura 19. Análisis de la innervación aferente en la capa molecular del DG de ratones WT y Tau^{-/-}. (A-L) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de los terminales glutamatérgicos (vGLUT-1, verde) y GABAérgicos (GAD-65, rojo) en las distintas subregiones de la capa molecular del DG de ratones WT y Tau^{-/-}. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). Los recuadros blancos punteados señalan las regiones dónde se han obtenido las imágenes ampliadas. (M-O) Representaciones gráficas de la cuantificación del % de área ocupada por terminales glutamatérgicos en la IML (M), MML (N) y EML (O) de ratones WT y Tau^{-/-}. El % de área ocupada por terminales glutamatérgicos en la MML es mayor en los ratones Tau^{-/-}. (P-R) Representaciones gráficas de la cuantificación del % de área ocupada por terminales GABAérgicos en la IML (P), MML (Q) y EML (R) de ratones WT y Tau^{-/-}. El % de área ocupada por terminales GABAérgicos en la MML y en la EML es mayor en los ratones Tau^{-/-}. Los asteriscos indican diferencias significativas: *0,05 > p ≥ 0,01; **0,01 > p ≥ 0,001; ***p < 0,001. Barras de escala 300 μm y 50 μm. EML: capa molecular externa. MML: capa molecular media. IML: capa molecular interna.

Puesto que los resultados apuntaban a un aumento de señalización aferente en la capa molecular de los animales Tau^{-/-}, se realizó un análisis mediante WB de los niveles de diferentes proteínas presinápticas -GAD-65, SNAP25 (*Synaptosomal-associated protein 25*) y VAMP2 (*Vesicle-Associated Membrane Protein 2*)- en el hipocampo de estos animales. Como se aprecia en la **Figura 20**, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de ninguno de los marcadores estudiados. Así pues, parece que el aumento de innervación observado en la inmunofluorescencia es un evento local que ocurre únicamente en determinadas zonas de la capa molecular, y que por tanto no se ve reflejado en un análisis global de la expresión de proteínas presinápticas en todo el hipocampo.

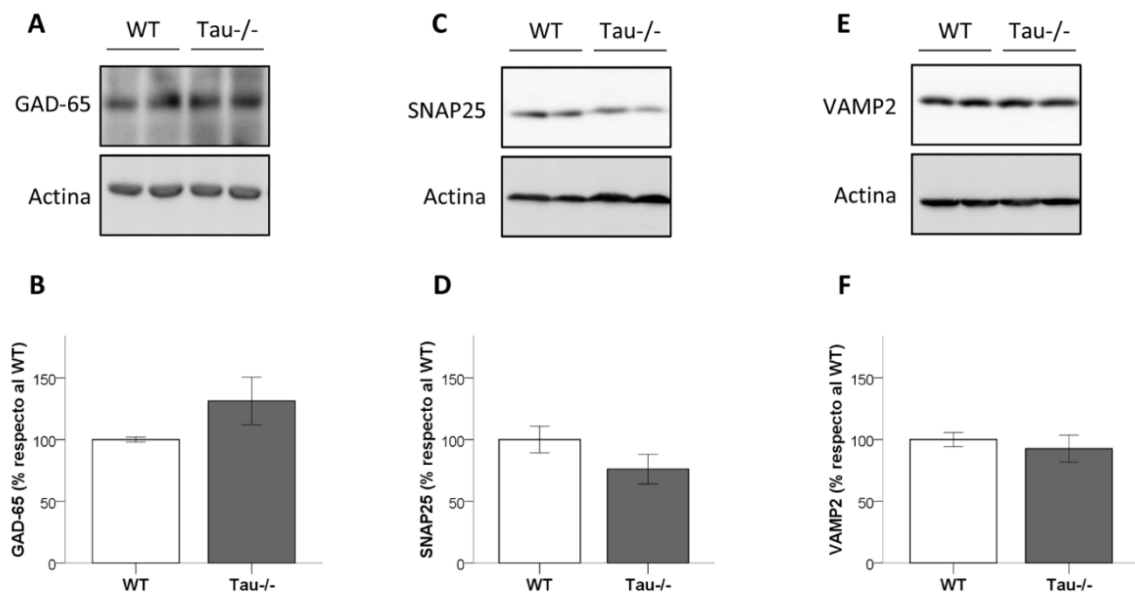


Figura 20. Análisis de la expresión de proteínas presinápticas en el hipocampo de los ratones WT y Tau^{-/-}. (A-B) Western Blot (WB) representativo (A) y cuantificación (B) de los niveles de la proteína GAD-65 en el hipocampo de ratones Tau^{-/-} y WT. (C-D) WB representativo (C) y cuantificación (D) de los niveles de la proteína SNAP25 en el hipocampo de ratones Tau^{-/-} y WT. (E-F) WB representativo (E) y cuantificación (F) de los niveles de la proteína VAMP2 en el hipocampo de ratones Tau^{-/-} y WT. No se han encontrado diferencias significativas en los niveles de ninguna de las proteínas presinápticas estudiadas. Como control de carga se utilizó la proteína actina.

1.6. La ausencia de Tau en ratones jóvenes provoca alteraciones comportamentales de tipo emocional

Se ha demostrado que el hipocampo desempeña un papel crucial tanto en procesos de memoria y aprendizaje como en comportamientos de tipo emocional (ansiedad y depresión) (David *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2010). Así pues, nos preguntamos si las alteraciones encontradas debido a la ausencia de Tau se traducirían en algún tipo de cambio en estos comportamientos.

Para comprobarlo, se llevó a cabo una batería de pruebas comportamentales relacionadas con la función hipocampal en ratones de 4 meses de edad (**Figura 8, grupos A y H**). Todas las pruebas comportamentales empleadas se detallan en el apartado 2.5 de Material y Métodos.

En primer lugar se sometió a los animales a un test de discriminación de patrones (*Novel Location Preference Test*). Este test valora la capacidad de los animales de formar patrones de actividad neuronal distintos para diferenciar dos contextos muy similares. El análisis de los datos no mostró diferencias significativas en el tiempo que pasan los ratones explorando el objeto situado en la nueva localización respecto al tiempo de exploración total (índice de memoria) (WT= $0,63 \pm 0,04$; Tau-/-= $0,56 \pm 0,04$) ($p = 0,201$). Esto significa que la capacidad de diferenciar entre dos contextos similares es igual en los animales WT y en los Tau-/- (**Figura 21**).

Memoria: *Novel Location Preference Test*

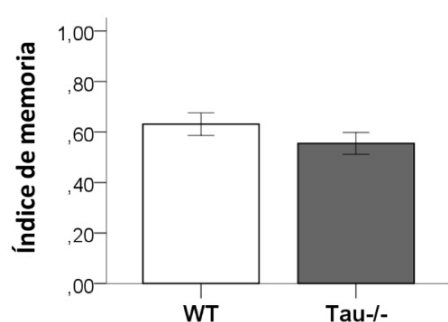


Figura 21. Análisis comportamental del efecto de la ausencia de Tau en la memoria hipocampal: *Novel Location Preference Test*. Representación gráfica del índice de memoria (tiempo de exploración del objeto situado en la nueva posición/tiempo de exploración total) de los ratones WT y Tau-/- sometidos al *Novel Location Preference Test*. No se encontraron diferencias significativas en el índice de memoria entre los dos genotipos.

A continuación se analizaron comportamientos de tipo emocional mediante dos pruebas diferentes: el test de Porsolt, que se utiliza para cuantificar la resistencia de los animales a mostrar un comportamiento de tipo depresivo frente a un estrés de gran intensidad de tipo agudo, y el EPM, que se utiliza para analizar el estado de ansiedad de los animales. El análisis del tiempo de inmovilidad en el test de Porsolt, que es el parámetro que se usa como indicador del comportamiento de tipo depresivo de los ratones, no reveló ninguna diferencia significativa entre ambos genotipos (WT= $50,7 \pm 3,5$; Tau-/-= $55,8 \pm 8,5$ segundos) ($p= 0,590$) (**Figura 22 A**). Los resultados del EPM, sin embargo, sí mostraron un comportamiento tipo ansiedad más acusado en los ratones Tau-/-, evidenciado por un menor tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto (WT= $143,1 \pm 17,1$; Tau-/-= $85,7 \pm 12,9$ segundos) ($p= 0,021$) (**Figura 22 B**).

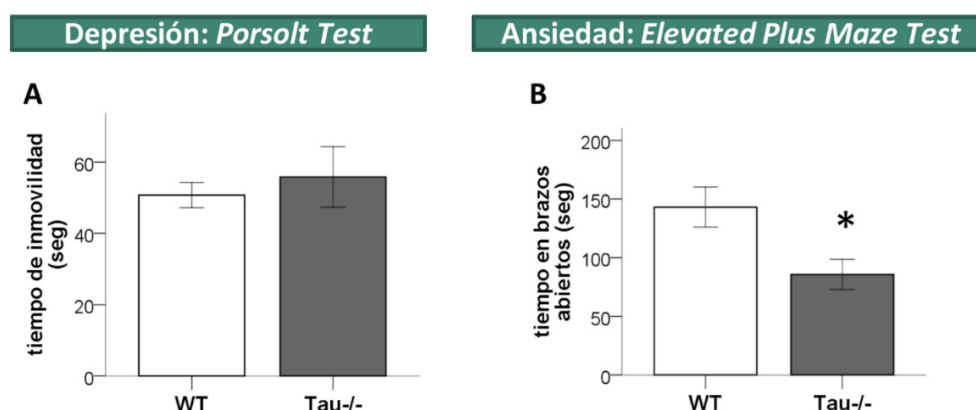


Figura 22. Análisis del efecto de la ausencia de Tau en comportamientos de tipo emocional: depresión y ansiedad. (A) Representación gráfica del tiempo de inmovilidad (segundos) de los ratones Tau-/- y WT en el test de Porsolt. El tiempo de inmovilidad de los ratones Tau-/- ante el estímulo depresivo no es significativamente diferente al de los WT. (B) Representación gráfica del tiempo que pasan los ratones Tau-/- y los WT en los brazos abiertos del laberinto durante el *Elevated Plus Maze Test*. Los ratones Tau-/- presentan un mayor comportamiento de tipo ansiedad, como indica el menor tiempo que pasan en los brazos abiertos en comparación con los WT. Los asteriscos indican diferencias significativas (* $0,05 > p \geq 0,01$).

En resumen, de los resultados anteriormente descritos puede concluirse que la ausencia de Tau no produce alteraciones en la memoria hipocampal ni en comportamientos de tipo depresivo. Sí produce, sin embargo, un aumento en el comportamiento tipo ansiedad de los ratones.

2. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre la neurogénesis hipocampal adulta en un modelo murino deficiente en la proteína Tau

Los estudios realizados hasta el momento aportan información acerca del papel de Tau en la neurogénesis hipocampal adulta en condiciones basales. Sin embargo, la formación de neuronas en el cerebro adulto es un proceso dinámico que puede ser modulado tanto positiva como negativamente por estímulos externos, permitiendo al individuo una correcta adaptación de su tasa de neurogénesis a las demandas de procesamiento de información requeridas en cada momento.

Así pues, el segundo objetivo de esta tesis fue analizar el efecto del enriquecimiento ambiental, un potente modulador positivo de la neurogénesis hipocampal adulta (Kempermann *et al.*, 1997), en los ratones Tau-/-.

Las condiciones de enriquecimiento ambiental utilizadas consistieron en una mezcla de estimulación cognitiva, interacción social y ejercicio físico (ver apartado 2.4 de Material y Métodos). Como control se utilizaron animales estabulados en condiciones estándar (Figura 23 A-B). El diseño experimental empleado se detalla en la Figura 23 C. Brevemente, se utilizaron animales WT y Tau-/- de 2 meses de edad al inicio del experimento que fueron sometidos a 8 semanas de enriquecimiento ambiental (EA) o que permanecieron en condiciones de estabulación control (EC). Para evitar relaciones de dominancia derivadas de la exposición al EA todos los animales utilizados fueron hembras. Se emplearon análogos de timidina para analizar el efecto del EA en la supervivencia de las nuevas neuronas a corto (1 semana de edad) y largo plazo (8 semanas de edad) (grupo F), y retrovirus PSD95-GFP para analizar la morfología y las PSDs de las neuronas sometidas a EA durante su maduración (8 semanas de edad) (grupo G).

Como se observa en la Figura 23 D, el EA provocó una disminución en el peso de los animales tanto WT como Tau-/- en comparación con los animales EC (WT EC= $23,4 \pm 0,7$; WT EA= $20,0 \pm 0,5$; Tau-/- EC= $26,0 \pm 1,0$; Tau-/- EA= $22,2 \pm 0,3$ g) ($F_{1,33} = 27,27$; $p < 0,001$), lo cual significa que los ratones de ambos genotipos interaccionaron de la misma manera con el ambiente. Además, el efecto estimulador general del EA sobre la neurogénesis hipocampal adulta, evidenciado por un aumento en el número de células positivas para DCX en comparación con los animales EC, se dio también en ambos genotipos (WT EC= 19237 ± 1637 ; WT EA= 46980 ± 3841 ; Tau-/- EC= 24122 ± 1423 ; Tau-/- EA= 47239 ± 3889 células totales) ($F_{1,33} = 73,12$; $p < 0,001$) (Figura 23 E-G).

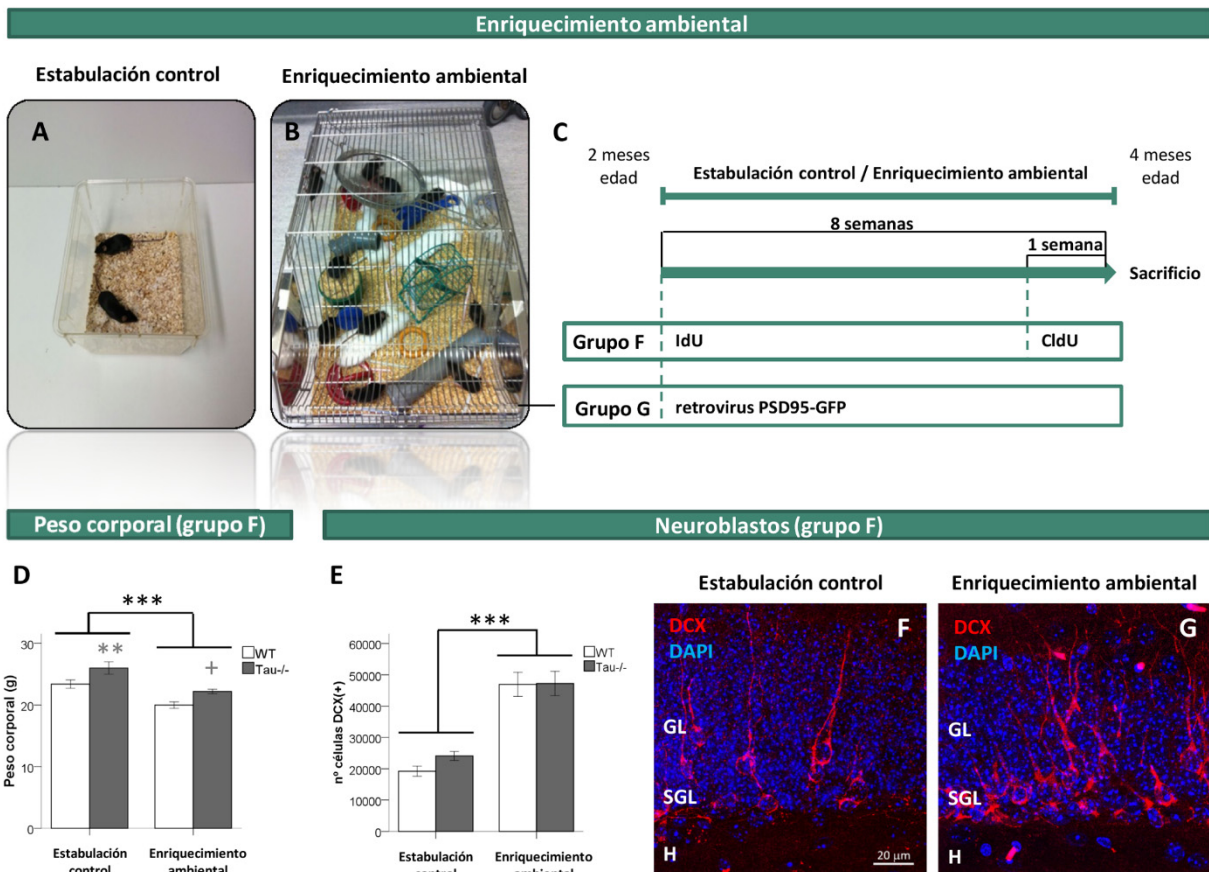


Figura 23. Enriquecimiento ambiental: efectos generales sobre el peso corporal y el nº de neuroblastos generados en el DG de ratones Tau^{-/-}. (A-B) Imágenes representativas de las condiciones de estabulación control (EC) (A) y enriquecimiento ambiental (EA) (B) utilizadas. (C) Esquema de los grupos de animales utilizados en el experimento de EA y sus tratamientos. (D) Representación gráfica del efecto del EA en el peso corporal de los ratones WT y Tau^{-/-}. Los ratones Tau^{-/-} pesan más que los WT tanto en condiciones de EC como de EA, pero el EA induce una pérdida de peso en los ratones de ambos genotipos. (E) Representación gráfica del efecto del EA sobre el nº de células DCX positivas en ratones WT y Tau^{-/-}. El EA produce un aumento en el nº de células DCX positivas tanto en animales WT como Tau^{-/-}. (F-G) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de células DCX positivas (rojo) en condiciones de EC (F) y EA (G). Los núcleos aparecen marcados en DAPI (azul). Barra de escala 20 µm. Los asteriscos negros indican diferencias significativas entre animales EC y EA: ***p<0,001. Los asteriscos grises indican diferencias significativas respecto al WT EC: **0,01 > p ≥ 0,001. Las cruces grises indican diferencias significativas respecto al WT EA: +0,05 > p ≥ 0,01. GL= capa granular, SGL=capa subgranular, H=hilus.

Así pues, de los resultados anteriores puede deducirse que todos los animales estabulados en condiciones de EA interaccionaron con el ambiente, y que además éste tuvo un efecto modulador positivo en la neurogénesis hipocampal adulta de todos ellos.

2.1. En ausencia de Tau el aumento en la supervivencia de las nuevas neuronas y el descenso en la muerte celular provocados por el EA son menores

A la vista de los resultados anteriores, y puesto que se ha descrito que el EA aumenta la supervivencia de las nuevas neuronas generadas en el DG de ratones WT (Kempermann *et al.*, 1997), decidimos analizar si tenía el mismo efecto en las neuronas de los animales deficientes en Tau.

Para ello se marcaron células de 1 y 8 semanas de edad mediante la administración de los análogos de timidina CldU e IdU a ratones WT y Tau^{-/-} sometidos a EA o a EC (Figura 23 C, grupo F). La metodología empleada para la administración de los análogos de timidina y para la cuantificación del número de células se detalla en los apartados 2.2 y 2.8.3 de Material y Métodos, respectivamente. Los resultados se presentan como porcentaje de células respecto a la media del WT EC.

Como se muestra en la Figura 24 A-E, el EA produjo un aumento en la supervivencia a corto plazo de las nuevas neuronas (1 semana de edad) que fue similar en animales WT y Tau^{-/-} (WT EC= 100,0 ± 10,2; WT EA= 156,2 ± 16,9; Tau^{-/-} EC= 90,4 ± 10,4; Tau^{-/-} EA= 161,5 ± 19,3 % de células respecto al WT EC) ($F_{1,31} = 16,02$; $p < 0,001$). Además, el EA produjo un aumento en la supervivencia a largo plazo (neuronas de 8 semanas de edad) también en ambos genotipos (WT EC= 100,0 ± 9,6; WT EA= 273,3 ± 23,6; Tau^{-/-} EC= 114,2 ± 12,8; Tau^{-/-} EA= 215,6 ± 9,1 % de células respecto al WT EC) ($F_{1,30} = 104,14$; $p < 0,001$). Sin embargo, en esta población sí se encontraron diferencias significativas entre el efecto del EA en animales WT y Tau^{-/-} ($F_{1,30} = 7,15$; $p = 0,013$), siendo el incremento en el porcentaje de supervivencia tras el EA significativamente menor en los animales Tau^{-/-} que en los WT ($p = 0,008$). Esta diferencia indica que el efecto pro-neurogénico producido por el EA fue menos pronunciado en los animales Tau^{-/-} que en los WT (Figura 24 F-J).

A continuación se analizaron también las tasas de muerte (número de células positivas para el marcador fractina) y proliferación celular (número de células positivas para el marcador PH3) en el DG de estos animales. De forma complementaria al aumento de supervivencia, el EA produjo un descenso significativo en el nivel de muerte celular en ambos genotipos (WT EC= 178 ± 10; WT EA= 33 ± 10; Tau^{-/-} EC= 194 ± 20; Tau^{-/-} EA= 75 ± 8 células fractina positivas totales en el DG) ($F_{1,32} = 98,10$; $p < 0,001$). No obstante, la reducción en el nivel de muerte celular producido por el EA resultó ser significativamente menor en los animales Tau^{-/-} que en los WT ($p = 0,043$), lo cual indica, una vez más, que el efecto neuroprotector del EA fue menos acusado en los animales

Tau^{-/-} que en los WT (**Figura 24 K**). El nivel de proliferación celular, sin embargo, no se vio afectado por el EA ni en animales WT ni en Tau^{-/-} (**Figura 24 L**).

En resumen, en ratones Tau^{-/-} el aumento en la supervivencia y el descenso en la tasa de muerte celular provocados por el EA resultaron ser menos pronunciados que en los ratones WT.

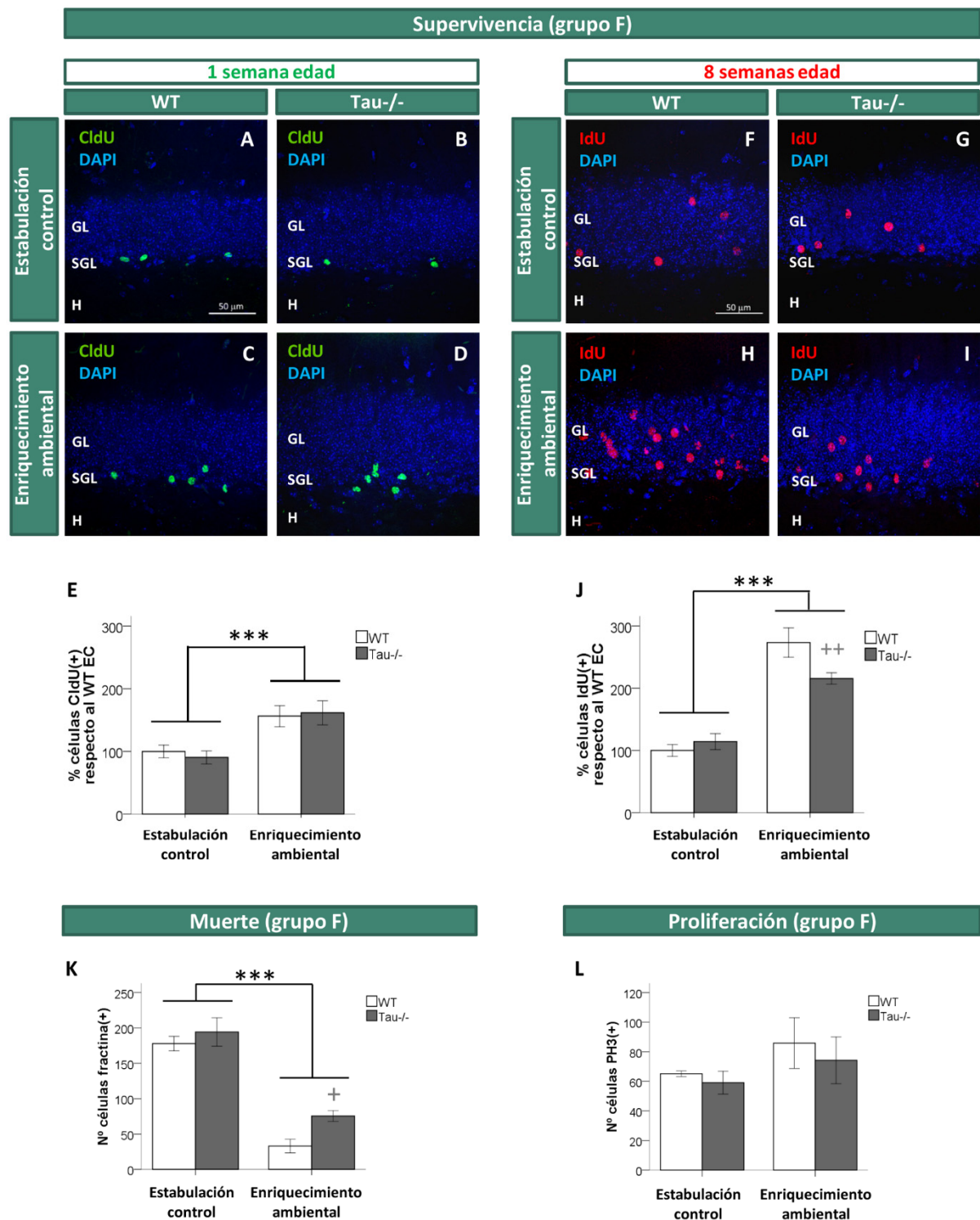


Figura 24. Efecto del EA en la supervivencia, muerte y proliferación celular en el DG de animales WT y Tau^{-/-}. (A-D) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia (IF) de células de 1 semana de edad marcadas con CldU (verde) en el giro dentado (DG) de ratones WT y Tau^{-/-} en condiciones de estabulación control (EC) (A-B) y de enriquecimiento ambiental (EA) (C-D). Los núcleos aparecen marcados con DAPI (azul). (E) Representación gráfica del % de células CldU positivas respecto al WT EC en el DG de ratones WT y Tau^{-/-} en condiciones de EC y de EA. El EA produce un aumento en la supervivencia de células de 1 semana de edad similar en animales WT y Tau^{-/-}. (F-I) Imágenes representativas de la IF de células de 8 semanas de edad marcadas con IdU (rojo) en el DG de ratones WT y Tau^{-/-} en condiciones de EC (F-G) y de EA (H-I). Los núcleos aparecen marcados con DAPI (azul). (J) Representación gráfica del % de células IdU positivas respecto al WT EC en el DG de ratones WT y Tau^{-/-} en condiciones de EC y de EA. El incremento en la supervivencia de las células de 8 semanas producido por el EA es mayor en los animales WT que en los Tau^{-/-}. (K) Representación gráfica de la tasa de muerte celular en el DG de los ratones WT y Tau^{-/-} en condiciones de EC y de EA, expresada como n° total de células fractina positivas. El EA produce una disminución en la tasa de muerte celular mayor en los animales WT que en los Tau^{-/-}. (L) Representación gráfica de la tasa de proliferación celular en el DG de los ratones WT y Tau^{-/-} en condiciones de EC y de EA, expresada como n° total de células PH3 positivas. El EA no tiene ningún efecto sobre la tasa de proliferación celular ni en animales WT ni en Tau^{-/-}. Los asteriscos negros indican diferencias significativas entre animales EC y EA: ***p<0,001. Las cruces grises indican diferencias significativas respecto al WT EA: +0,05 > p ≥ 0,01; ++0,01 > p ≥ 0,001. Barras de escala 50 µm. GL= capa granular, SGL=capa subgranular, H=hilus.

2.2. En ausencia de Tau no se producen los efectos estimuladores del EA sobre la morfología y las PSDs de las nuevas neuronas

Además de ejercer efectos positivos sobre la supervivencia celular, se ha demostrado que el EA también modifica la morfología y las sinapsis de las nuevas neuronas (van Praag *et al.*, 2000). Así pues, a continuación decidimos realizar un análisis morfométrico de las neuronas de los ratones Tau^{-/-} sometidas a EA durante su proceso de maduración. Para ello se analizaron neuronas de 8 semanas de edad que habían sido marcadas en el momento de su formación mediante la infección con retrovirus PSD95-GFP (Figura 23 C, grupo G) como se detalla en el apartado 2.3 de Material y Métodos.

2.2.1. En ausencia de Tau no se produce el aumento en la longitud y en la ramificación dendrítica que tiene lugar en las nuevas neuronas de los animales WT en condiciones de EA

En primer lugar se cuantificaron los parámetros de longitud y ramificación del árbol dendrítico de las nuevas neuronas de los animales WT y Tau^{-/-} en condiciones de EC y de EA siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.8.5.1 de Material y Métodos.

Como se había visto previamente en el apartado 1.4.1 de Resultados, en condiciones de EC la longitud y la ramificación dendrítica de las nuevas neuronas de 8 semanas de edad de los ratones Tau^{-/-} son prácticamente indistinguibles de las de los WT. El efecto del EA, sin embargo, no fue el mismo en animales WT y Tau^{-/-} ($F_{1,131} = 4,26$; $p = 0,041$). Mientras que en las nuevas neuronas de los ratones WT se produjo un incremento en la longitud total del árbol dendrítico como consecuencia del EA (WT EC = $703,9 \pm 24,8$; WT EA = $834,9 \pm 30,7 \mu\text{m}$) ($p = 0,001$), en las

nuevas neuronas de los animales Tau-/- no se observó ninguna diferencia significativa respecto a las condiciones control (Tau-/- EC= $744,9 \pm 24,8$; Tau-/- EA= $763,6 \pm 28,8 \mu\text{m}$) ($p=0,629$) (Figura 25 E). En cuanto a la ramificación del árbol dendrítico, el EA no produjo a grandes rasgos diferencias en las neuronas de los animales Tau-/-, a excepción de un descenso en el tramo más distal (Tau-/- EC= $1,51 \pm 0,52$; Tau-/- EA= $0,00 \pm 0,00$ intersecciones) ($p=0,004$). Sin embargo, en las neuronas de los animales WT produjo un incremento en las regiones comprendidas entre las 50 y las 100 (WT EC= $20,08 \pm 0,89$; WT EA= $23,46 \pm 0,71$ intersecciones) ($p=0,004$) y entre las 100 y las 150 μm de distancia al soma (WT EC= $20,46 \pm 1,16$; WT EA= $24,33 \pm 1,28$ intersecciones) ($p=0,011$) (Figura 25 F).

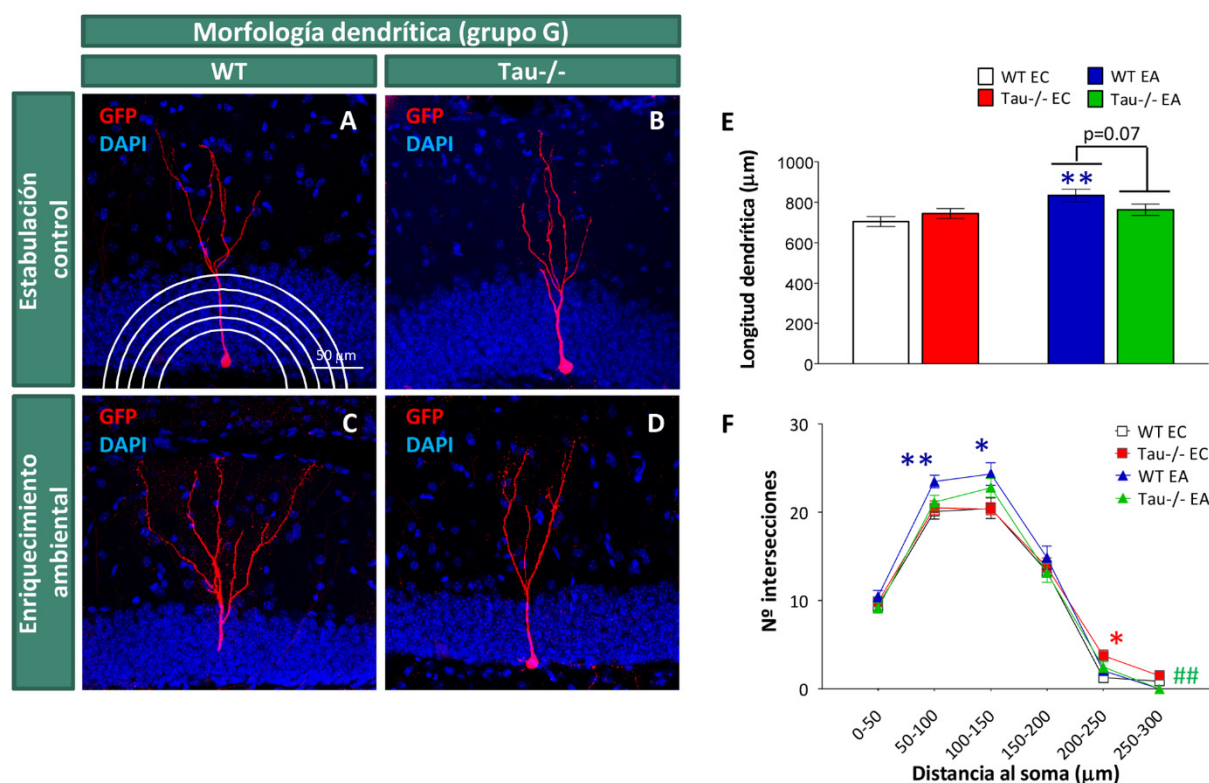


Figura 25. Efecto del EA en la longitud y ramificación dendrítica de las nuevas neuronas del DG de ratones WT y Tau-/-. (A-D) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia en cortes sagitales de hipocampo de neuronas de 8 semanas de edad infectadas con retrovirus PSD95-GFP en animales WT y Tau-/- estabulados en condiciones de EC (A-B) y de EA (C-D). La proteína GFP aparece en rojo, y los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). En (A) se muestra una representación esquemática de las circunferencias concéntricas empleadas para el análisis de Sholl. Barra de escala 50 μm . (E) Representación gráfica del análisis de la longitud dendrítica total en cada grupo experimental. El EA produce un aumento significativo de longitud dendrítica en los ratones WT pero no en los Tau-/- (F) Representación gráfica del análisis de ramificación dendrítica (análisis de Sholl), expresado como nº de intersecciones en función de la distancia al soma, en cada grupo experimental. El EA produce un aumento significativo en la ramificación de las dendritas de las neuronas de los ratones WT en el tramo comprendido entre 50 y 150 μm de distancia al soma, pero no produce cambios relevantes en los ratones Tau-/. Los asteriscos de colores indican diferencias significativas entre el grupo de ese color y el WT EC: * $0,05 > p \geq 0,01$; ** $0,01 > p \geq 0,001$. Las almohadillas de colores indican diferencias significativas entre el grupo de ese color y el Tau-/- EC: ## $0,01 > p \geq 0,001$. EC: estabulación control. EA: enriquecimiento ambiental.

2.2.2. El efecto del EA sobre las PSDs de las nuevas neuronas es diferente en animales WT y Tau-/-

En último término, las neuronas se adaptan a la demanda de actividad a la que están sometidas mediante cambios en sus conexiones sinápticas. Así pues, a continuación decidimos analizar el efecto del EA en el número y en el tamaño de las PSDs de las nuevas neuronas en animales WT y Tau-/. La metodología utilizada se detalla en el apartado 2.8.5.2 de Material y Métodos.

Como se observa en la **figura 26 A-L**, el EA produjo un incremento significativo en el número de PSDs/ μm en las dendritas proximales de 2º orden de los animales WT (WT EC= $0,40 \pm 0,04$; WT EA= $1,00 \pm 0,09$ PSDs/ μm) ($p < 0,001$). En los ratones Tau-/-, sin embargo, no sólo no se produce este aumento en las dendritas de 2º orden (Tau-/- EC= $0,36 \pm 0,05$; Tau-/- EA= $0,44 \pm 0,06$ PSDs/ μm) ($p = 0,235$), sino que en las dendritas distales de 5º orden, que en condiciones de EC ya tenían menos PSDs/ μm que las de los animales WT (WT EC= $1,66 \pm 0,12$; Tau-/- EC= $1,35 \pm 0,09$ PSDs/ μm) ($p = 0,019$), el número disminuye todavía más tras el EA (Tau-/- EC= $1,35 \pm 0,09$; Tau-/- EA= $0,99 \pm 0,07$ PSDs/ μm) ($p = 0,006$) (**Figura 26 M**).

En cuanto al área de las PSDs, se observó una disminución en condiciones de EA que tuvo lugar en ambos genotipos en las dendritas de 4º (WT EC= $0,125 \pm 0,007$; WT EA= $0,103 \pm 0,006$; Tau-/- EC= $0,148 \pm 0,008$; Tau-/- EA= $0,099 \pm 0,006 \mu\text{m}^2$) ($F_{1,7109} = 25,98$; $p < 0,001$) y 5º orden (WT EC= $0,154 \pm 0,007$; WT EA= $0,126 \pm 0,007$; Tau-/- EC= $0,130 \pm 0,007$; Tau-/- EA= $0,083 \pm 0,005 \mu\text{m}^2$) ($F_{1,6960} = 25,27$; $p < 0,001$). Sin embargo, en los animales Tau-/- esta disminución ocurrió también en las dendritas de 2º (Tau-/- EC= $0,108 \pm 0,014$; Tau-/- EA= $0,049 \pm 0,005 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,001$) y 3º orden (Tau-/- EC= $0,144 \pm 0,010$; Tau-/- EA= $0,099 \pm 0,006 \mu\text{m}^2$) ($p < 0,001$), mientras que en los animales WT el área de las PSDs en las dendritas proximales no se vio afectada por el EA (**Figura 26 N**).

En resumen, a grandes rasgos podría decirse que el EA produce en los animales WT un aumento en el nº de PSDs/ μm en las dendritas proximales y una disminución de su tamaño en las dendritas distales. En los animales Tau-/-, sin embargo, el EA produce un descenso en el número de PSDs en las dendritas distales de 5º orden y una disminución general de su tamaño en todo el árbol dendrítico.

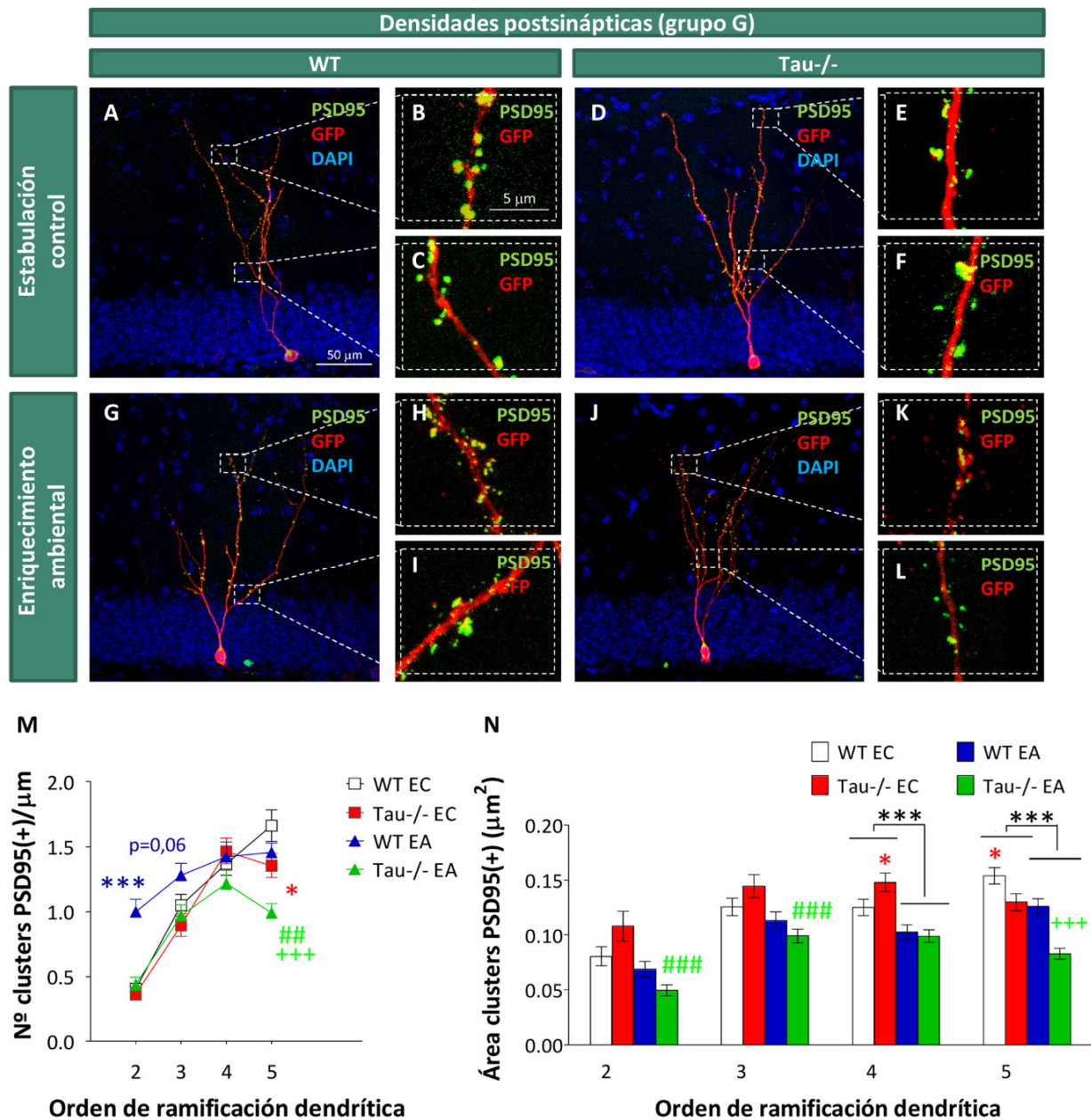


Figura 26. Efecto del EA en el nº y tamaño de las PSDs de las nuevas neuronas del DG de ratones WT y Tau^{-/-}. (A-L) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia en cortes sagitales de hipocampo de neuronas de 8 semanas de edad infectadas con retrovirus PSD95-GFP en animales WT y Tau^{-/-} estabulados en condiciones de EC (A-F) y de EA (G-L). Los recuadros blancos punteados señalan las regiones donde se han obtenido las imágenes ampliadas de las PSDs. En verde se muestran las PSDs, y en rojo la proteína GFP marcando la morfología neuronal. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). Barras de escala 50 µm y 5 µm. (M) Representación gráfica del nº de PSDs/µm a lo largo del árbol dendrítico de las neuronas cada grupo experimental. El EA aumenta el nº de PSDs/µm en las dendritas proximales de las neuronas de los animales WT. En los animales Tau^{-/-}, por el contrario, no sólo no aumenta el nº de PSDs/µm en las dendritas proximales, sino que lo disminuye en las dendritas distales. (N) Representación gráfica del área de las PSDs a lo largo del árbol dendrítico de las neuronas cada grupo experimental. El EA disminuye el área de las PSDs en todo el árbol dendrítico de los animales Tau^{-/-}, pero sólo en las dendritas de 4º y 5º orden de los animales WT. Los asteriscos negros indican diferencias significativas entre animales EC y EA: ***p<0,001. Los asteriscos de colores indican diferencias significativas entre el grupo de ese color y el WT EC: *0,05 > p ≥ 0,01; ***p<0,001. Las cruces de colores indican diferencias significativas entre el grupo de ese color y el WT EA: +++p<0,001. Las almohadillas de colores indican diferencias significativas entre el grupo de ese color y Tau^{-/-} EC: ##0,01 > p ≥ 0,001; ###p<0,001. EC: establación control; EA: enriquecimiento ambiental. SGL: capa subgranular. H: hilus.

2.2.3. En ausencia de Tau no se produce el incremento en el tamaño de los terminales axónicos de las nuevas neuronas que tiene lugar en los ratones WT sometidos a EA

Además de modificar sus conexiones postsinápticas para recibir una mayor cantidad de aferencias, otro punto importante de adaptación al medio en las neuronas son sus axones y terminales axónicos, a través de los cuales envían la información recibida a sus zonas de proyección. Por consiguiente, a continuación decidimos analizar el efecto del EA sobre el tamaño de los terminales axónicos en CA3 de las nuevas neuronas en animales WT y Tau^{-/-}. Los análisis se llevaron a cabo en las neuronas marcadas con los retrovirus PSD95-GFP como se detalla en el apartado 2.8.5.3 de Material y Métodos.

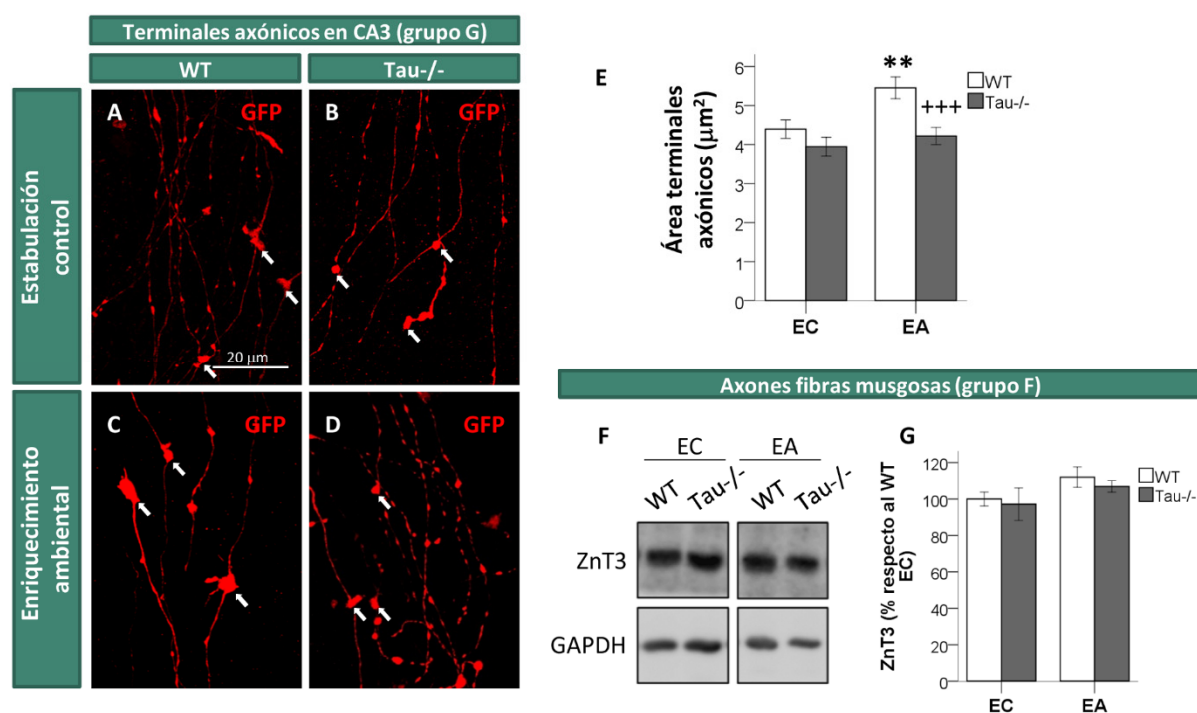


Figura 27. Efecto del EA en los axones de las neuronas granulares del DG de ratones WT y Tau^{-/-}. (A-D) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia contra GFP (rojo) de neuronas infectadas con retrovirus PSD95-GFP en ratones WT y Tau^{-/-} en condiciones de EC (A, B) y de EA (C, D). Barra de escala 20 μm. (E) Cuantificación del área de los terminales axónicos en CA3 en cada grupo experimental. El EA produce un incremento significativo en el área de los terminales axónicos en CA3 únicamente en las neuronas de los ratones WT. (F, G) Western Blot representativo (F) y cuantificación (G) de los niveles del marcador de fibras musgosas ZnT3 en el hipocampo de ratones WT y Tau^{-/-} en condiciones de EC y de EA. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales estudiados. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al WT EC: **0,01 > p ≥ 0,001. Las cruces indican diferencias significativas respecto al WT EA: +++p<0,001. EC: estabulación control. EA: enriquecimiento ambiental.

Como se había visto en el apartado 1.4.3 de Resultados, el área de los terminales axónicos de las neuronas de 8 semanas de edad es similar en ratones WT y Tau^{-/-} en condiciones de EC. En condiciones de EA, sin embargo, se produce un aumento en el área de los terminales axónicos únicamente en las neuronas de los animales WT (WT EC= $4,4 \pm 0,2$; WT EA= $5,4 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$) ($p=0,002$) y no en las de los Tau^{-/-} (Tau^{-/-} EC= $3,9 \pm 0,2$; Tau^{-/-} EA= $4,2 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$) ($p=0,440$) (**Figura 27 E**).

Para comprobar si el EA ejercía también algún efecto sobre los axones de las neuronas granulares del DG en general, se realizó un análisis mediante WB de la cantidad de proteína ZnT3 en el hipocampo de animales WT y Tau^{-/-} en condiciones de EC y de EA. Como se observa en la **Figura 27 F-G**, no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales estudiados.

2.3. En ausencia de Tau no se produce el aumento en la señalización GABAérgica que tiene lugar en los animales WT sometidos a EA

Una vez terminado el estudio de los cambios morfológicos producidos por el EA en las nuevas neuronas de los animales WT y Tau^{-/-}, y puesto que en ausencia de Tau parece que no se producen los mismos efectos que en los animales WT, decidimos estudiar si esas diferencias podían deberse en parte a cambios en la innervación aferente que llega a estas neuronas.

Puesto que se ha descrito que incrementos en la señalización GABAérgica podrían estar relacionados con neuroprotección de las nuevas neuronas del DG ([Song et al., 2013](#)), se analizó mediante inmunofluorescencia el % de área ocupada por terminales GABAérgicos (GAD-65) en la capa molecular del DG de animales WT y Tau^{-/-} en condiciones de EC y de EA (**Figura 28 A-H**). El análisis se llevó a cabo de manera independiente en la capa molecular interna (IML), media (MML), y externa (EML) como se detalla en el apartado 2.8.4 de Material y Métodos.

Los resultados mostraron que el EA produce un incremento en el porcentaje de área ocupada por terminales GABAérgicos en la IML tanto en animales WT como Tau^{-/-} (WT EC= $32,93 \pm 0,12$; WT EA= $33,86 \pm 0,36$; Tau^{-/-} EC= $33,06 \pm 0,13$; Tau^{-/-} EA= $34,39 \pm 0,30$ % área ocupada) ($F_{1,183}= 20,56$; $p<0,001$) (**Figura 28 I**). En la MML, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los ratones estabulados en condiciones de EC y de EA en ninguno de los dos genotipos (**Figura 28 J**). En la EML, por último, se observó un aumento en la señalización GABAérgica provocada por el EA en los animales WT (WT EC= $24,92 \pm 0,06$; WT EA= $27,92 \pm 0,76$ % área ocupada) ($p<0,001$) pero no en los Tau^{-/-} (Tau^{-/-} EC= $27,67 \pm 0,56$; Tau^{-/-} EA= $27,12 \pm 0,41$ % área ocupada) ($p=0,399$) (**Figura 28 K**).

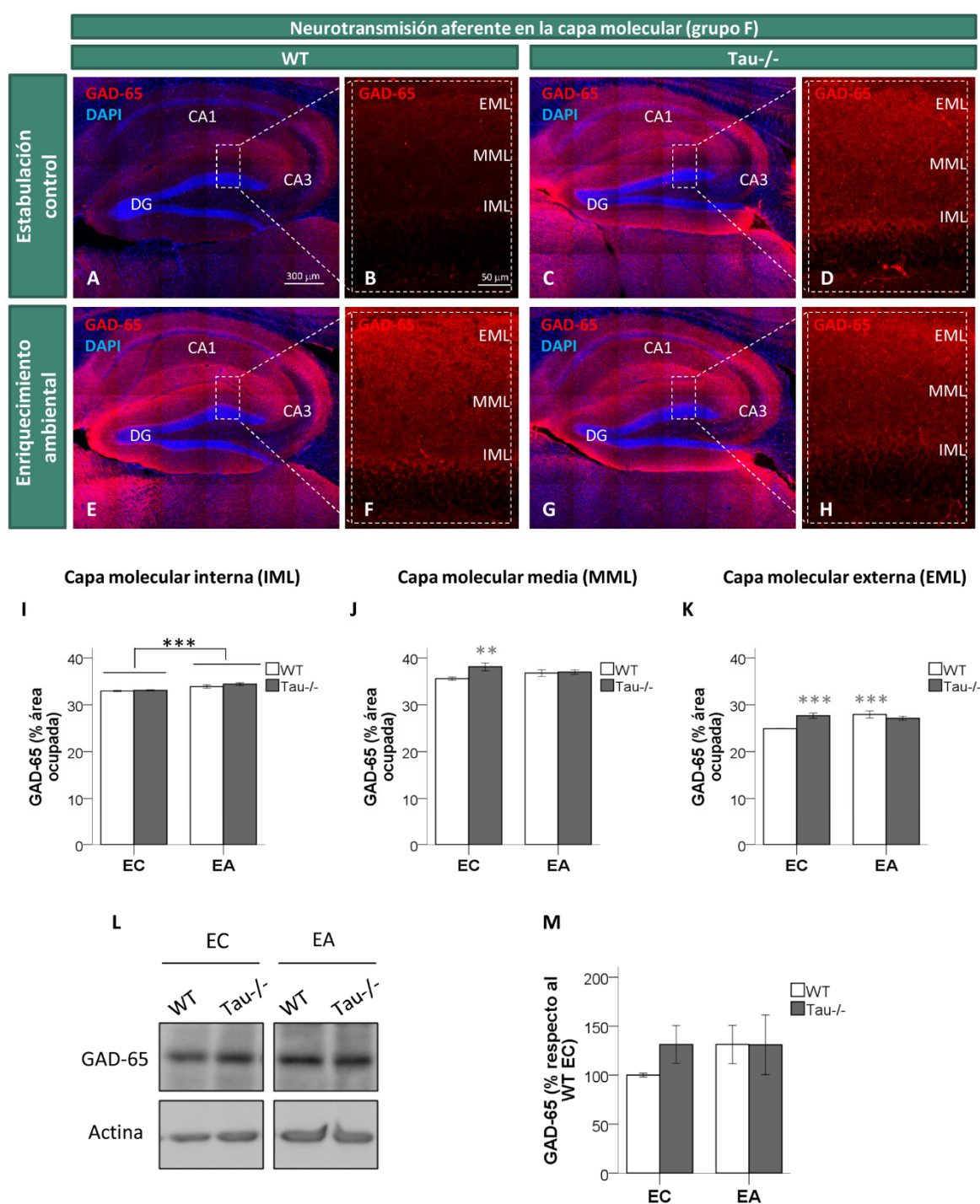


Figura 28. Efecto del EA en la innervación aferente en la capa molecular del DG de ratones WT y Tau-/-. (A-H) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia de los terminales GABAérgicos (GAD-65, rojo) en las distintas subregiones de la capa molecular del DG de ratones WT y Tau-/- en condiciones de EC (A-D) y de EA (E-H). Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). Los recuadros blancos punteados señalan las regiones dónde se han obtenido las imágenes ampliadas. Barras de escala 300 μ m y 50 μ m. (I-K) Representaciones gráficas de la cuantificación del % de área ocupada por los terminales GABAérgicos en la IML (I), MML (J) y EML (K) de cada grupo experimental. En general el EA produce un aumento en la señalización GABAérgica que es más acusado en los animales WT que en los Tau-/- . (L-M) Western Blot representativo (L) y cuantificación (M) de la expresión de la proteína GAD-65 en el hipocampo de ratones WT y Tau-/- en condiciones de EC y de EA. No se han encontrado diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales estudiados. Los asteriscos negros indican diferencias significativas entre animales EC y EA: *** $p < 0,001$. Los asteriscos grises indican diferencias significativas respecto al WT EC: ** $0,01 > p \geq 0,001$; *** $p < 0,001$. EC: estabilación control. EA: enriquecimiento ambiental. EML: capa molecular externa. MML: capa molecular media. IML: capa molecular interna.

En resumen, parece que el EA produce un aumento en la señalización GABAérgica que resulta más acusado en el caso de los animales WT que en de los Tau-/- . Para comprobar si este aumento se veía reflejado al analizar de manera conjunta todo el hipocampo mediante técnicas bioquímicas se llevó a cabo un estudio mediante WB de la cantidad de proteína GAD-65 en el hipocampo de ratones WT y Tau-/- en condiciones de EC y de EA. No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales estudiados (**Figura 28 L-M**), de lo cual podría deducirse que el aumento en la señalización GABAérgica que ocurre con el EA es un evento muy localizado en una zona concreta. De manera complementaria se analizaron también los niveles de las proteínas VAMP2 y SNAP25, que se utilizan como marcadores generales de vesículas presinápticas. En el caso de VAMP2 tampoco se encontraron diferencias significativas, pero sí que se observó una tendencia al aumento de SNAP25 en ambos genotipos con el EA (WT EC= 100,00 \pm 3,71; WT EA= 142,22 \pm 32,40; Tau-/- EC= 76,09 \pm 12,09; Tau-/- EA= 128,19 \pm 29,72 % respecto a la media de los WT EC) ($F_{1,23}=4,05$, $p= 0,06$) (datos no mostrados).

3. Efecto del estrés agudo sobre la neurogénesis hipocampal adulta en un modelo murino deficiente en la proteína Tau

Además de ser modulada por estímulos positivos, la neurogénesis hipocampal adulta también puede ser regulada negativamente por diversas condiciones externas. De hecho, la relación que existe entre el proceso de neurogénesis hipocampal adulta, el estrés y la depresión es aún objeto de estudio en la actualidad. Así pues, el último objetivo de esta tesis fue analizar el efecto de la ausencia de Tau sobre la neurogénesis hipocampal adulta en presencia de un estímulo modulador negativo de la misma.

Para llevar a cabo este estudio se empleó como estímulo modulador negativo el estrés agudo producido por el test de Porsolt, que ya había demostrado anteriormente disminuir la supervivencia de las nuevas neuronas generadas en el hipocampo ([Llorens-Martin et al., 2011b](#)). En la **Figura 29** se recogen los grupos de animales utilizados y los tratamientos a los que fueron sometidos. Por una parte se analizó la supervivencia de subpoblaciones de células de 1, 4 y 8 semanas de edad marcadas con análogos de timidina (grupos H e I), y por otra parte se analizaron la morfología y las PSDs de nuevas neuronas de 4 y 8 semanas de edad infectadas mediante inyección estereotáxica con retrovirus PSD95-GFP (grupos J y K). La metodología utilizada para la administración de los tratamientos se describe en los apartados 2.2 y 2.3 de Material y Métodos, respectivamente. Durante los dos días previos a su sacrificio los ratones fueron sometidos al test de Porsolt (P) como de detalla en el apartado 2.5.3 de Material y Métodos. Como control se utilizaron animales con los mismos tratamientos, pero no sometidos al test de Porsolt (NP).

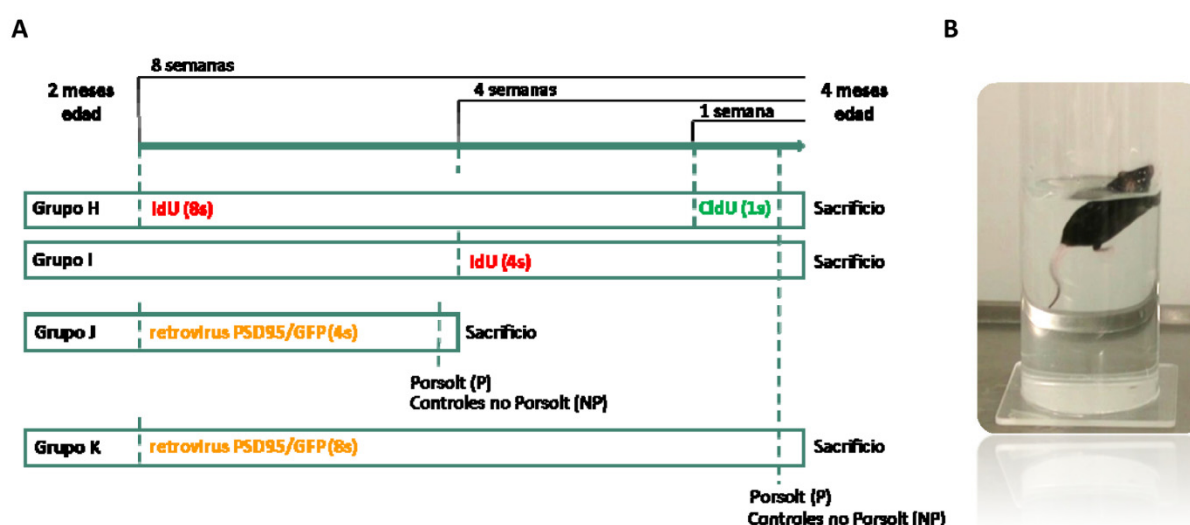


Figura 29. Diseño experimental para la inducción de estrés agudo: test de Porsolt. (A) Esquema de los grupos de animales utilizados con sus correspondientes tratamientos. A los grupos H e I se les administraron análogos de timidina (CldU e IdU) para analizar la supervivencia en el DG de poblaciones celulares de 1, 4 y 8 semanas de edad. Los grupos J y K fueron infectados a los 2 meses de edad con retrovirus PSD95-GFP mediante inyección esterotáxica en el hipocampo para analizar la morfología y las PSDs de nuevas neuronas granulares de 4 y 8 semanas de edad. Para la inducción de estrés agudo se sometió a los ratones al test de Porsolt (P) durante los dos días previos a su sacrificio. Como control se utilizaron ratones con los mismos tratamientos pero sin ser sometidos al test de Porsolt (NP). (B) Imagen representativa de un ratón durante el test de Porsolt.

3.1. La ausencia de Tau atenúa la reducción en la supervivencia de las nuevas neuronas producida por el estrés agudo en animales WT

En primer lugar se analizó el efecto del estrés provocado por el test de Porsolt en la supervivencia de poblaciones de células marcadas con los análogos de timidina CldU (células de 1 semana de edad) (**Figura 29, grupo H**) e IdU (células de 8 y 4 semanas de edad) (**Figura 29, grupos H e I**). La cuantificación del número de células se llevó a cabo como se detalla en el apartado 2.8.3 de Material y Métodos, y los resultados se muestran como porcentaje de células respecto a la media de los WT NP.

Como se aprecia en la **Figura 30**, el test de Porsolt redujo en ambos genotipos la supervivencia de las células de 1 (WT NP= $100,0 \pm 5,9$; WT P= $34,4 \pm 5,2$; Tau^{-/-} NP= $95,0 \pm 8,0$; Tau^{-/-} P= $74,9 \pm 6,9$ % de células respecto a los WT NP) ($F_{1,52} = 39,14$; $p < 0,001$), 4 (WT NP= $100,0 \pm 8,4$; WT P= $30,3 \pm 7,2$; Tau^{-/-} NP= $122,2 \pm 16,0$; Tau^{-/-} P= $80,9 \pm 13,3$ % de células respecto a los WT NP) ($F_{1,20} = 20,32$; $p < 0,001$), y 8 semanas de edad (WT NP= $100,0 \pm 9,6$; WT P= $44,7 \pm 12,5$; Tau^{-/-} NP= $114,2 \pm 12,8$; Tau^{-/-} P= $70,7 \pm 14,0$ % de células respecto a los WT NP) ($F_{1,28} = 16,25$; $p < 0,001$). No obstante, la supervivencia de las células de 1 y 4 semanas de edad de los animales Tau^{-/-} tras el Porsolt resultó ser significativamente mayor que la de los animales WT tras el

Resultados

Porsolt (1 semana $p<0,001$; 4 semanas $p=0,012$), lo cual indica que en estas poblaciones el efecto negativo del estrés fue menos acusado en los animales Tau-/- que en los WT. No ocurrió así en las células de 8 semanas de edad, en las que la reducción de la tasa de supervivencia tras el Porsolt fue similar en animales WT y Tau-/- ($p=0,177$).

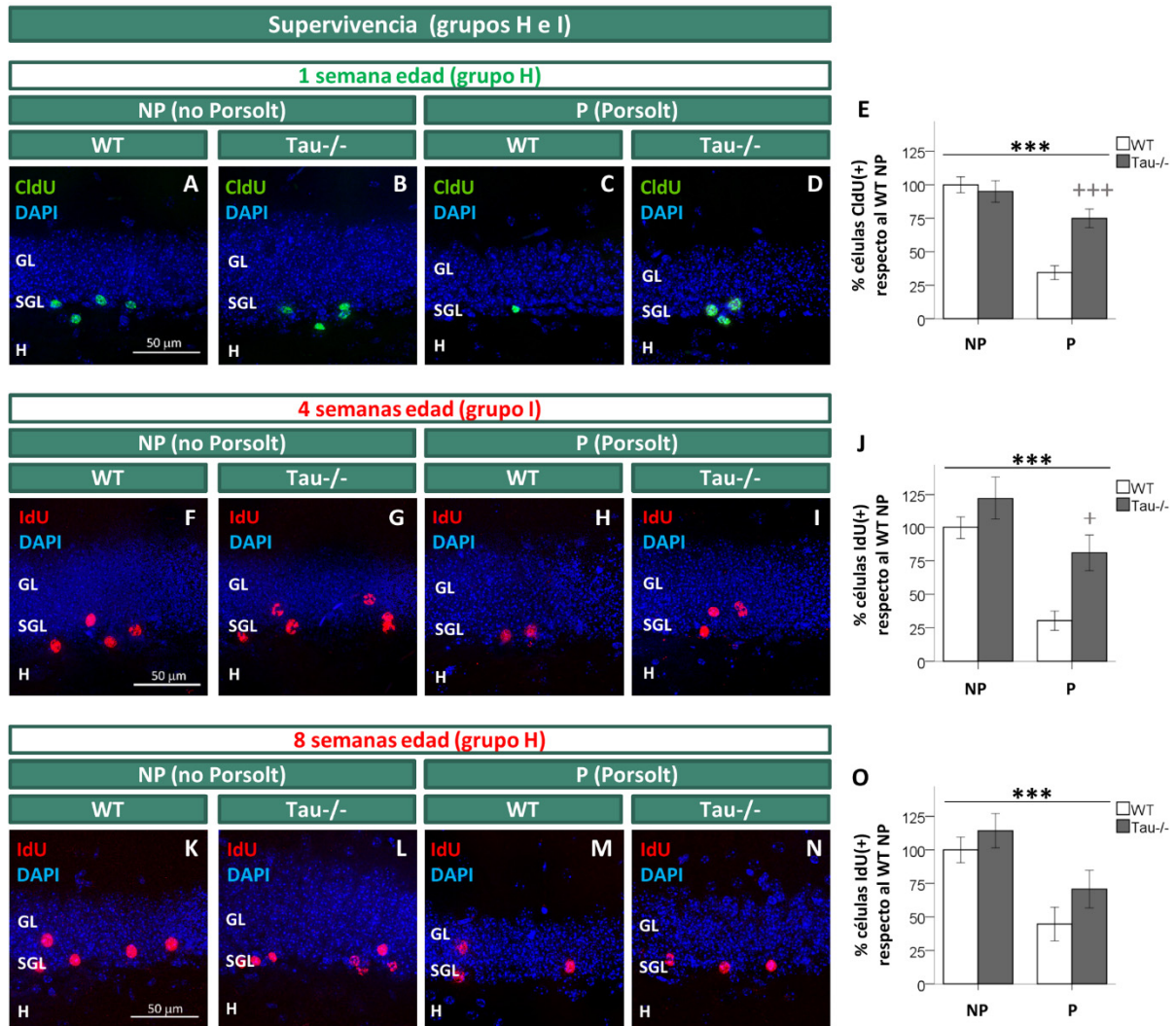


Figura 30. Efecto del estrés agudo sobre la supervivencia celular en el DG de ratones WT y Tau-/-. (A-D) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia (IF) de células de 1 semana de edad marcadas con CldU (verde) en el giro dentado (DG) de ratones WT y Tau-/- en condiciones control (NP) o sometidos al estrés agudo provocado por el test de Porsolt (P). Los núcleos aparecen marcados con DAPI (azul). (E) Representación gráfica del % de células CldU positivas respecto a los WT NP en el DG de ratones WT y Tau-/- en condiciones NP y P. La reducción en la supervivencia celular causada por el test de Porsolt fue menos acusada en los animales Tau-/- . (F-I) Imágenes representativas de la IF de células de 4 semanas de edad marcadas con IdU (rojo) en el DG de ratones WT y Tau-/- en condiciones NP y P. Los núcleos aparecen marcados con DAPI (azul). (J) Representación gráfica del % de células IdU positivas respecto a los WT NP en el DG de ratones WT y Tau-/- en condiciones NP y P. La reducción en la supervivencia celular causada por el test de Porsolt fue menos acusada en los animales Tau-/- . (K-N) Imágenes representativas de la IF de células de 8 semanas de edad marcadas con IdU (rojo) en el DG de ratones WT y Tau-/- en condiciones NP y P. Los núcleos aparecen marcados con DAPI (azul). (O) Representación gráfica del % de células IdU positivas respecto a los WT NP en el DG de ratones WT y Tau-/- en condiciones NP y P. La reducción en la supervivencia celular causada por el test de Porsolt fue igual en ambos genotipos. Los asteriscos negros indican diferencias significativas entre animales NP y P: *** $p<0,001$. Las cruces grises indican diferencias significativas respecto al WT P: + $0,05 > p \geq 0,01$; +++ $p<0,001$. Barras de escala 50 μ m. GL= capa granular, SGL=capa subgranular, H=hilus.

Así pues, parece que el estrés producido por el test de Porsolt ocasiona un descenso en la supervivencia de las nuevas neuronas de 1,4 y 8 semanas de edad en ambos genotipos, aunque de manera más acusada en los WT en las neuronas de 1 y 4 semanas de edad (neuronas en desarrollo) y de igual manera en las de 8 semanas de edad (neuronas maduras).

A pesar de esta reducción en la supervivencia de las tres poblaciones celulares estudiadas, el análisis de la tasa de muerte general en el DG (analizada como número de células fractina positivas) no se vio afectada por el test de Porsolt ni en los animales WT ni en los Tau^{-/-} (datos no mostrados).

3.2. La ausencia de Tau contrarresta parcialmente los efectos negativos del estrés agudo sobre la morfología y las PSDs de las nuevas neuronas

Una vez analizado el efecto de la ausencia de Tau sobre la reducción de la supervivencia de las nuevas neuronas granulares producida por el estrés agudo, nos preguntamos si estas células sometidas al test de Porsolt presentarían diferencias respecto a los animales WT en cuanto a su morfología y conectividad. Para comprobarlo se analizaron nuevas neuronas en proceso de maduración (4 semanas de edad) (**Figura 29, grupo J**) y maduras (8 semanas de edad) (**Figura 29, grupo K**) marcadas con retrovirus PSD95-GFP en animales WT y Tau^{-/-}, sometidos o no al test de Porsolt.

3.2.1. La ausencia de Tau previene las alteraciones morfológicas producidas por el estrés agudo en las nuevas neuronas

En primer lugar se llevó a cabo el análisis morfométrico de la longitud y la ramificación del árbol dendrítico de las neuronas marcadas con los retrovirus siguiendo la metodología indicada en el apartado 2.8.5.1 de Material y Métodos.

Como se muestra en la **Figura 31 A-F**, el test de Porsolt produjo una tendencia a disminuir la longitud dendrítica total de las células de 4 semanas de edad en los animales WT (WT NP= 790,5 ± 26,7; WT P= 719,9 ± 30,5 μm) (p= 0,080), pero no en los Tau^{-/-} (Tau^{-/-} NP= 611,6 ± 24,3; Tau^{-/-} P= 672,4 ± 31,9 μm) (p= 0,132) (**Figura 31 E**). Respecto a la ramificación del árbol dendrítico, curiosamente el test de Porsolt no produjo grandes cambios en los animales WT, a excepción de una disminución en la ramificación entre las 200 y las 250 μm de distancia al soma (WT NP= 3,00 ± 0,61; WT P= 1,41 ± 0,30 intersecciones) (p= 0,029). En los animales Tau^{-/-}, sin embargo, el test de Porsolt produjo cambios en una gran parte del árbol dendrítico. En condiciones basales los animales deficientes en Tau presentaban una ramificación inferior a la de los WT en los tramos comprendidos entre las 100 y las 150 (WT NP= 22,23 ± 1,12; Tau^{-/-} NP= 18,71 ± 0,96

intersecciones) ($p= 0,019$), y entre las 150 y las 200 μm de distancia al soma (WT NP= $14,77 \pm 1,36$; Tau-/- NP= $5,87 \pm 0,69$ intersecciones) ($p<0,001$), así como una ramificación superior a la de los WT en el tramo comprendido entre las 250 y las 300 μm de distancia al soma (WT NP= $0,29 \pm 0,20$; Tau-/- NP= $2,31 \pm 0,62$ intersecciones) ($p= 0.009$). Sin embargo, tras el test de Porsolt mostraron variaciones en la ramificación en estos tramos que los situaron en valores similares a los de los WT (**Figura 31 F**). Así pues, parece que el estrés producido por el Porsolt en neuronas en desarrollo provoca cambios en la longitud dendrítica en los animales WT y cambios en la ramificación en los animales Tau-/-.

En cuanto a las neuronas maduras de 8 semanas de edad (**Figura 31 G-L**), el test de Porsolt redujo significativamente la longitud dendrítica total en los ratones WT (WT NP= $684,0 \pm 21,7$; WT P= $560,1 \pm 26,7 \mu\text{m}$) ($p<0,001$), pero no en los Tau-/- (Tau-/- NP= $720,7 \pm 19,0$; Tau-/- P= $703,2 \pm 30,2 \mu\text{m}$) ($p= 0,623$) (**Figura 31 K**). Consecuentemente, el efecto negativo del test de Porsolt sobre la ramificación del árbol dendrítico también resultó ser menos acusado en los animales Tau-/- que en los WT. Aunque en ambos genotipos se produjo una disminución en el número de intersecciones entre las 50 y las 100 μm de distancia al soma (WT NP= $19,34 \pm 0,76$; WT P= $15,57 \pm 0,74$; Tau-/- NP= $21,12 \pm 0,64$; Tau-/- P= $17,48 \pm 0,73$ intersecciones) ($F_{1,133}= 26,19$; $p<0,001$), los animales Tau-/- no experimentaron alteraciones en ninguna otra región en relación a sus controles Tau-/- NP. Los animales WT, sin embargo, sufrieron adicionalmente una disminución en la zona comprendida entre las 100 y las 150 μm de distancia al soma (WT NP= $20,46 \pm 1,16$; WT P= $16,13 \pm 1,11$ intersecciones) ($p= 0,002$), y un aumento en las zonas comprendidas entre las 200 y las 250 (WT NP= $1,15 \pm 0,27$; WT P= $3,30 \pm 0,57$ intersecciones) ($p= 0,017$) y entre las 250 y las 300 μm de distancia al soma (WT NP= $0,86 \pm 0,41$; WT P= $2,95 \pm 0,66$ intersecciones) ($p= 0,008$) (**Figura 31 L**).

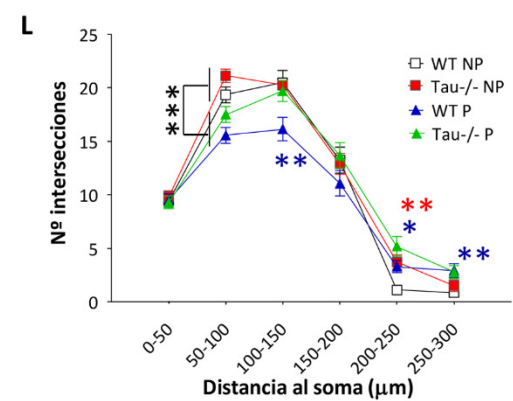
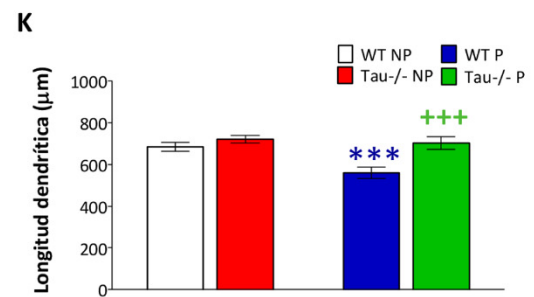
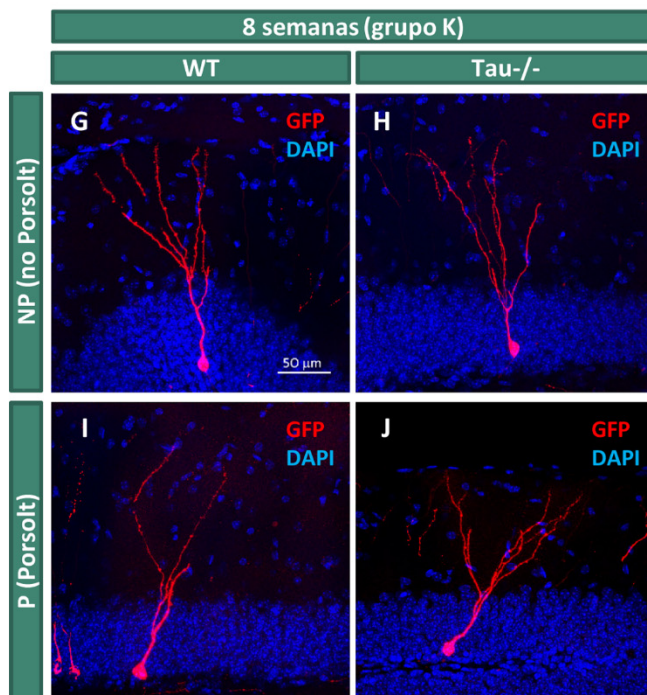
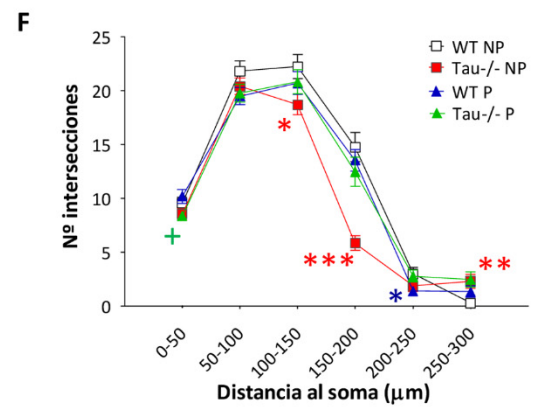
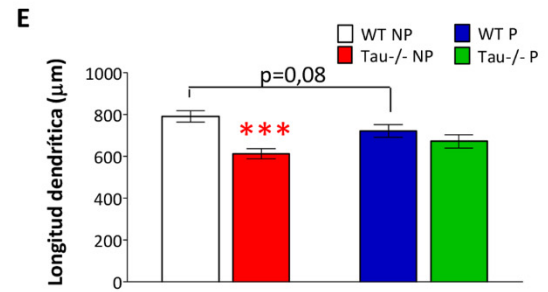
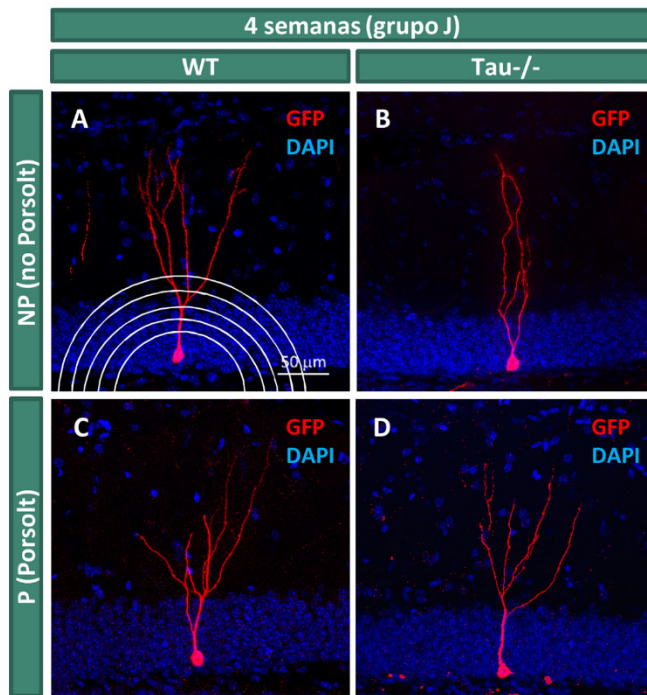


Figura 31. Efecto del estrés agudo en la longitud y ramificación dendrítica de las nuevas neuronas del DG de ratones WT y Tau-/-. Los análisis se llevaron a cabo en neuronas de 4 (A-F) y 8 semanas de edad (G-L) infectadas con retrovirus PSD95-GFP en animales WT y Tau-/- sometidos (P) o no (NP) al test de Porsolt. (A-D) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia (IF) contra GFP de neuronas de 4 semanas de edad en cortes sagitales de hipocampo. La proteína GFP aparece en rojo, y los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). En (A) se muestra una representación esquemática de las circunferencias concéntricas empleadas para el análisis de Sholl. (E) Representación gráfica del análisis de longitud dendrítica total de las neuronas de 4 semanas de edad en cada grupo experimental. Tras el test de Porsolt la longitud dendrítica total de las neuronas de 4 semanas tiende a disminuir en los animales WT, pero no en los Tau-/. (F) Representación gráfica del análisis de ramificación dendrítica (análisis de Sholl), expresado como n° de intersecciones en función de la distancia al soma, de las neuronas de 4 semanas de edad en cada grupo experimental. El test de Porsolt disminuye la ramificación dendrítica distal de las neuronas de 4 semanas de edad en los animales WT. En las neuronas de los animales Tau-/-, sin embargo, el test de Porsolt corrige las alteraciones encontradas en condiciones basales. (G-J) Imágenes representativas de la IF contra GFP de neuronas de 8 semanas de edad en cortes sagitales de hipocampo. La proteína GFP aparece en rojo, y los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). (K) Representación gráfica del análisis de longitud dendrítica total de neuronas de 8 semanas de edad en cada grupo experimental. Tras el test de Porsolt disminuye la longitud dendrítica total de las neuronas de 8 semanas de edad en los animales WT, pero no en los Tau-/. (L) Representación gráfica del análisis de Sholl de neuronas de 8 semanas de edad en cada grupo experimental. En general tras el test de Porsolt disminuye la ramificación dendrítica proximal y aumenta la distal en las neuronas de 8 semanas de edad en los animales WT, pero no en los Tau-/. Los asteriscos negros indican diferencias significativas entre animales NP y P: ***p < 0,001. Los asteriscos de colores indican diferencias significativas entre el grupo de ese color y el WT NP: *0,05 > p ≥ 0,01; **0,01 > p ≥ 0,001; ***p < 0,001. Las cruces de colores indican diferencias significativas entre el grupo de ese color y el WT P: +0,05 > p ≥ 0,01; +++p < 0,001. Barras de escala 50 μm. NP: no Porsolt. P: Porsolt. SGL: capa subgranular. H: hilus.

3.2.2. La ausencia de Tau reduce los efectos del estrés agudo sobre las PSDs de las nuevas neuronas

Una vez evaluadas las consecuencias del estrés agudo sobre la morfología dendrítica, se procedió con el estudio de su efecto en el número y tamaño de las PSDs de las nuevas neuronas de 4 y 8 semanas de edad en los animales WT y Tau-/. Los análisis se llevaron a cabo como se describe en el apartado 2.8.5.2 de Material y Métodos.

En primer lugar se analizaron las neuronas en desarrollo de 4 semanas de edad. Como se observa en la **Figura 32**, en los animales WT el test de Porsolt produjo un descenso en el número de PSDs/μm en las dendritas de 3º (WT NP= 1,06 ± 0,07; WT P= 0,81 ± 0,05 PSDs/μm) (p= 0,006) y 4º orden (WT NP= 1,28 ± 0,07; WT P= 1,00 ± 0,06 PSDs/μm) (p= 0,002) de estas neuronas. En los animales Tau-/-, sin embargo, este descenso sólo ocurrió en las dendritas de 4º orden (Tau-/- NP= 1,21 ± 0,05; Tau-/- P= 1,01 ± 0,06 PSDs/μm) (p= 0,020) (**Figura 32 I**). A pesar de reducir la densidad de PSDs, el test de Porsolt tan sólo produjo un aumento en el área de las mismas en las dendritas de 5º orden de ramificación dendrítica. Dicho aumento tuvo lugar en ambos genotipos (WT NP= 0,091 ± 0,007; WT P= 0,117 ± 0,006; Tau-/- NP= 0,098 ± 0,005; Tau-/- P= 0,129 ± 0,006 μm²) (F_{1, 5860}= 23,37; p<0,001) (**Figura 32 J**).

A continuación se analizó el efecto del Porsolt en las neuronas maduras de 8 semanas de edad. Como se observa en la **Figura 33**, en los animales WT la reducción en el número de PSDs/μm provocada por el Porsolt se hace extensiva a todo el árbol dendrítico: dendritas de 2º

(WT NP= 0.46 ± 0.06 ; WT P= 0.28 ± 0.05 PSDs/ μm) ($p=0,019$), 3º (WT NP= 1.05 ± 0.08 ; WT P= 0.70 ± 0.06 PSDs/ μm) ($p= 0,003$), 4º (WT NP= 1.37 ± 0.09 ; WT P= $1,00 \pm 0.10$ PSDs/ μm) ($p= 0,005$), y 5º orden (WT NP= 1.66 ± 0.12 ; WT P= 1.22 ± 0.10 PSDs/ μm) ($p= 0,003$). En los animales Tau-/-, sin embargo, esta reducción permanece limitada a las dendritas de 4º orden (Tau-/- NP= 1.47 ± 0.10 ; Tau-/- P= 1.14 ± 0.06 PSDs/ μm) ($p= 0,007$) (**Figura 33 I**). El análisis del área de las PSDs, por su parte, no reveló ninguna diferencia significativa derivada del Porsolt ni en animales WT ni en Tau-/- (**Figura 33 J**).

En resumen, parece que el estrés producido por el test de Porsolt reduce la densidad de PSDs en las nuevas neuronas de los animales WT, siendo este efecto más acusado cuanto más madura es la neurona. En los animales Tau-/-, sin embargo, esta reducción ocurre solamente en las dendritas de 4º orden a las dos edades estudiadas, de lo que puede deducirse que la ausencia de Tau neutraliza, en cierta medida, las alteraciones que el test de Porsolt produce en las PSDs de las nuevas neuronas granulares.

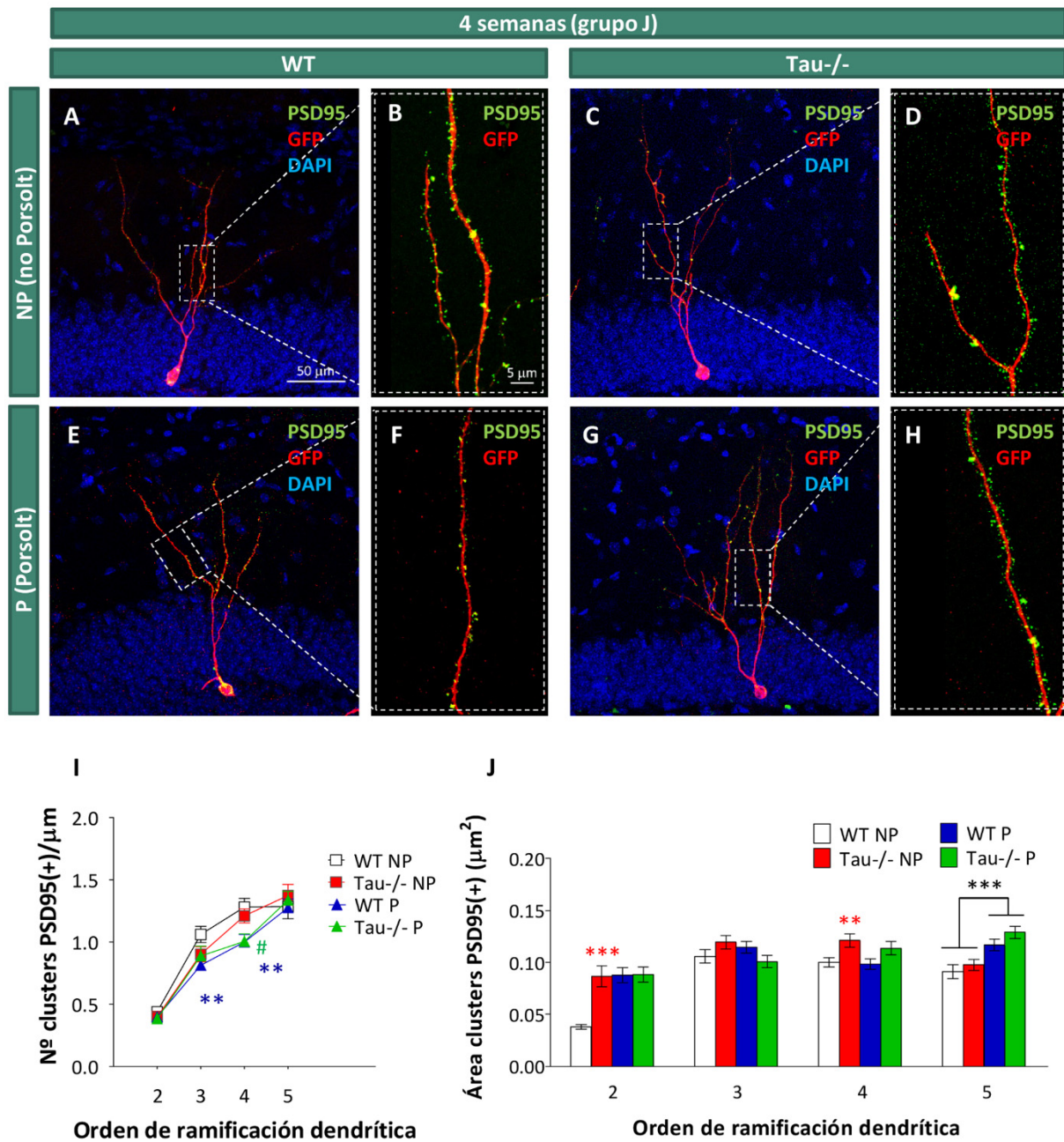


Figura 32. Efecto del estrés agudo en el n° y tamaño de las PSDs de las nuevas neuronas de 4 semanas de edad en el DG de ratones WT y Tau^{-/-}. Los análisis se llevaron a cabo en neuronas infectadas con retrovirus PSD95-GFP en animales WT y Tau^{-/-} sometidos (P) o no (NP) al test de Porsolt. **(A-H)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia en cortes sagitales de hipocampo de neuronas de 4 semanas de edad. En verde se muestran las PSDs, y en rojo la proteína GFP marcando la morfología neuronal. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). **(I)** Representación gráfica del n° de PSDs/ μ m a lo largo del árbol dendrítico de las neuronas de cada grupo experimental. El test de Porsolt disminuye la densidad de PSDs en las dendritas de 3° y 4° orden de las neuronas de 4 semanas de edad en los animales WT, pero sólo en las de 4° orden en los animales Tau^{-/-}. **(J)** Representación gráfica del área de las PSDs a lo largo del árbol dendrítico de las neuronas de cada grupo experimental. El test de Porsolt aumenta el área de las PSDs en las dendritas de 5° orden en ambos genotipos. Los asteriscos negros indican diferencias significativas entre animales NP y P: *** $p < 0,001$. Los asteriscos de colores indican diferencias significativas entre el grupo de ese color y el WT NP: ** $0,01 > p \geq 0,001$; *** $p < 0,001$. Las almohadillas de colores indican diferencias significativas entre el grupo de ese color y el Tau^{-/-} NP: # $0,05 > p \geq 0,01$. Los recuadros blancos punteados en las imágenes señalan las regiones donde se han obtenido las ampliaciones de las PSDs. Barras de escala 50 μ m y 5 μ m. NP: no Porsolt. P: Porsolt. SGL: capa subgranular. H: hilus.

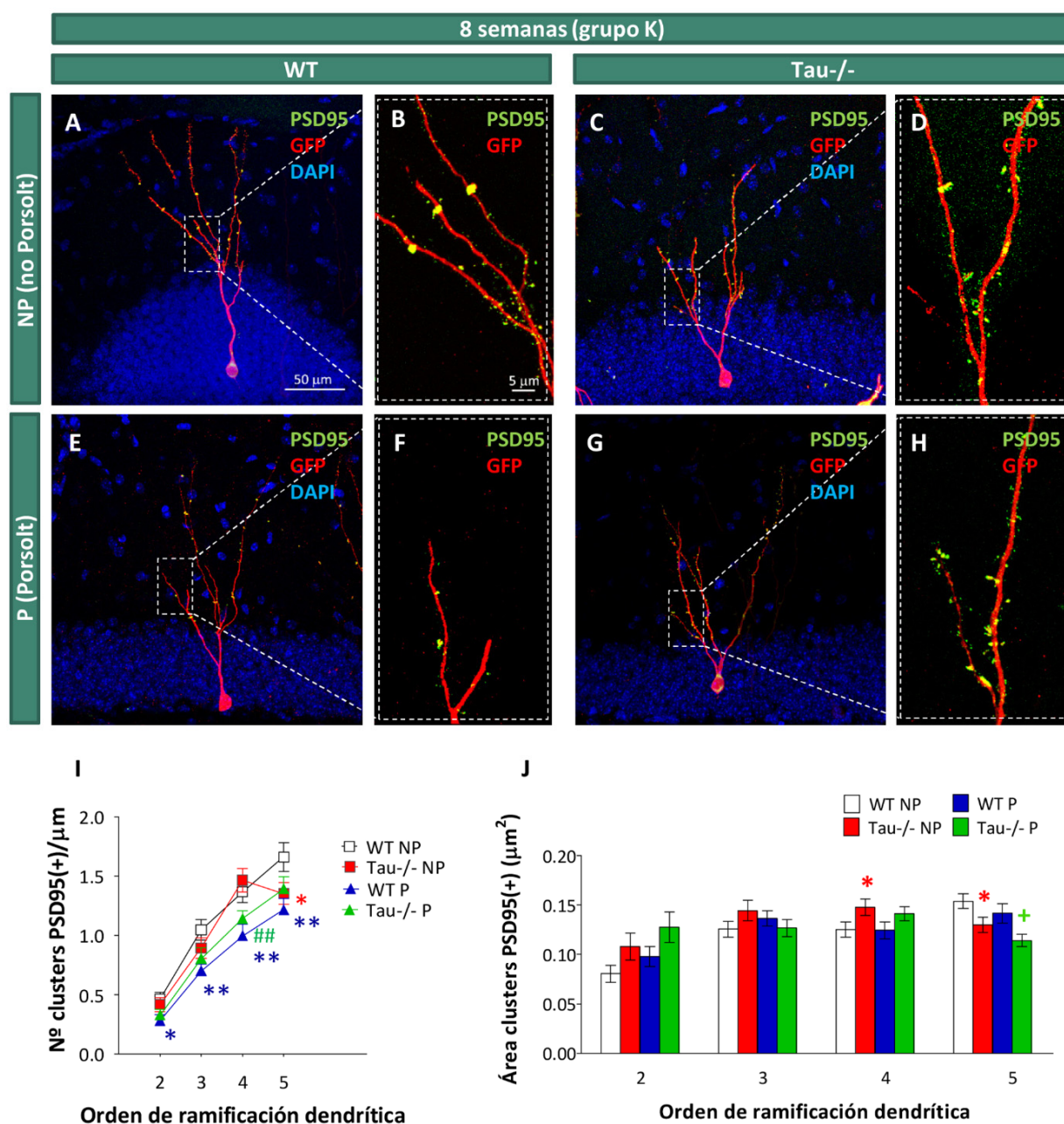


Figura 33. Efecto del estrés agudo en el n° y tamaño de las PSDs de las nuevas neuronas de 8 semanas de edad en el DG de ratones WT y Tau^{-/-}. Los análisis se llevaron a cabo en neuronas infectadas con retrovirus PSD95-GFP en animales WT y Tau^{-/-} sometidos (P) o no (NP) al test de Porsolt. **(A-H)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia en cortes sagitales de hipocampo de neuronas de 8 semanas de edad. En verde se muestran las PSDs, y en rojo la proteína GFP marcando la morfología neuronal. Los núcleos aparecen teñidos con DAPI (azul). **(I)** Representación gráfica del n° de PSDs/ μ m a lo largo del árbol dendrítico de las neuronas de cada grupo experimental. El test de Porsolt disminuye la densidad de PSDs en todo el árbol dendrítico de las neuronas de 8 semanas de edad de los animales WT, pero sólo en las dendritas de 4º orden de las neuronas de los animales Tau^{-/-}. **(J)** Representación gráfica del área de las PSDs a lo largo del árbol dendrítico de las neuronas de cada grupo experimental. El test de Porsolt no produce cambios significativos en el área de las PSDs de las neuronas de 8 semanas de edad en ninguno de los dos genotipos. Los asteriscos de colores indican diferencias significativas entre el grupo de ese color y el WT NP: *0,05 > p \geq 0,01; **0,01 > p \geq 0,001. Las cruces de colores indican diferencias significativas entre el grupo de ese color y el WT P: +0,05 > p \geq 0,01. Las almohadillas de colores indican diferencias significativas entre el grupo de ese color y el Tau^{-/-} NP: ##0,01 > p \geq 0,001. Los recuadros blancos punteados en las imágenes señalan las regiones donde se han obtenido las ampliaciones de las PSDs. Barras de escala 50 μ m y 5 μ m. NP: no Porsolt. P: Porsolt. SGL: capa subgranular. H: hilus.

A la vista de estos resultados, y para comprobar si la disminución del número de PSDs tras el Porsolt es un hecho que tiene lugar de manera general en el hipocampo o, por el contrario, ocurre de manera selectiva en las nuevas neuronas granulares, decidimos analizar mediante WB los niveles de diferentes proteínas postsinápticas en el hipocampo de ratones WT y Tau^{-/-} sometidos o no al test de Porsolt. En primer lugar se analizó el nivel de la proteína PSD95, no encontrándose diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales estudiados (datos no mostrados). A continuación se analizaron los niveles de las proteínas NR2B y GLUR1. En el caso de la proteína NR2B tampoco se detectaron diferencias significativas entre los grupos experimentales analizados (datos no mostrados), pero sí se observó no obstante una disminución en la cantidad de GLUR1 en el hipocampo de los ratones WT sometidos al Porsolt en relación a sus controles (WT NP=100,00 ± 17,41; WT P= 18,79 ± 4,43 % respecto a la media de los WT NP) (p=0,006). Cabe destacar que esta disminución no tuvo lugar en el hipocampo de los ratones Tau^{-/-} (Tau^{-/-} NP= 92,18 ± 21,48; Tau^{-/-} P= 55,96 ± 24,62 % respecto a la media de los WT NP) (p= 0,213) (**Figura 34**).

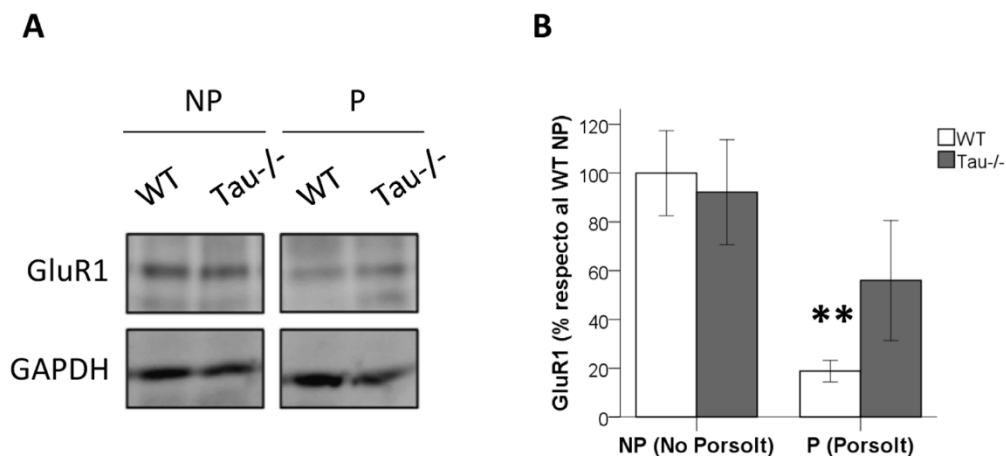


Figura 34. Efecto del estrés agudo en la expresión de proteínas postsinápticas en ratones WT y Tau^{-/-}: receptores de glutamato tipo AMPA. (A) Western Blot representativo de la expresión en el hipocampo de la subunidad GluR1 del receptor de glutamato tipo AMPA en ratones WT y Tau^{-/-} sometidos (P) o no (NP) al test de Porsolt. Como control de carga se utilizó la proteína GAPDH. (B) Representación gráfica de la cuantificación de la expresión de GluR1 en cada grupo experimental, expresada como % respecto al WT NP. El estrés agudo producido por el test de Porsolt provoca una disminución en la expresión de GluR1 en el hipocampo de los ratones WT pero no en el de los Tau^{-/-}. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al WT NP: **0,01 > p ≥ 0,001. NP: no Porsolt. P: Porsolt.

3.2.3. La ausencia de Tau previene las alteraciones en los terminales axónicos de las nuevas neuronas producidos por el estrés agudo

Una vez analizadas las consecuencias del test de Porsolt en las dendritas y las PSDs de las nuevas neuronas, nos preguntamos si este tipo de estrés afectaría también a su dominio axonal. Para comprobarlo se analizó en primer lugar el área de los terminales axónicos en CA3 de las neuronas de 4 y 8 semanas de edad de animales WT y Tau^{-/-}, sometidos o no al test de Porsolt.

Como se observa en la **figura 35 A-E**, el estrés producido por el test de Porsolt no tuvo efecto alguno sobre el tamaño de los terminales axónicos de las neuronas de 4 semanas de edad en ninguno de los dos genotipos. En las neuronas de 8 semanas de edad, sin embargo, el efecto del Porsolt sobre el tamaño de los terminales axónicos fue distinto en los animales WT y Tau^{-/-} ($F_{1, 693} = 7,06$; $p = 0,008$). Mientras que en los animales WT se produjo una disminución significativa en el tamaño de los terminales axónicos (WT NP= $4,4 \pm 0,2$; WT P= $3,7 \pm 0,2 \mu\text{m}^2$) ($p = 0,038$), en los animales Tau^{-/-} se produjo una tendencia al aumento de tamaño en los mismos (Tau^{-/-} NP= $3,9 \pm 0,2$; Tau^{-/-} P= $4,6 \pm 0,3 \mu\text{m}^2$) ($p = 0,089$) (**Figura 35 F-J**).

Finalmente, para completar el estudio se llevó a cabo un análisis mediante WB de la expresión del marcador de fibras musgosas ZnT3 en el hipocampo de ratones WT y Tau^{-/-} sometidos o no al test de Porsolt. Nuevamente, no se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos experimentales estudiados (**Figura 35 K-L**).

En resumen, el estrés producido por el test de Porsolt provocó, en los animales WT pero no en los Tau^{-/-}, una disminución significativa en el tamaño de los terminales axónicos en CA3 de las neuronas granulares de 8 semanas de edad.

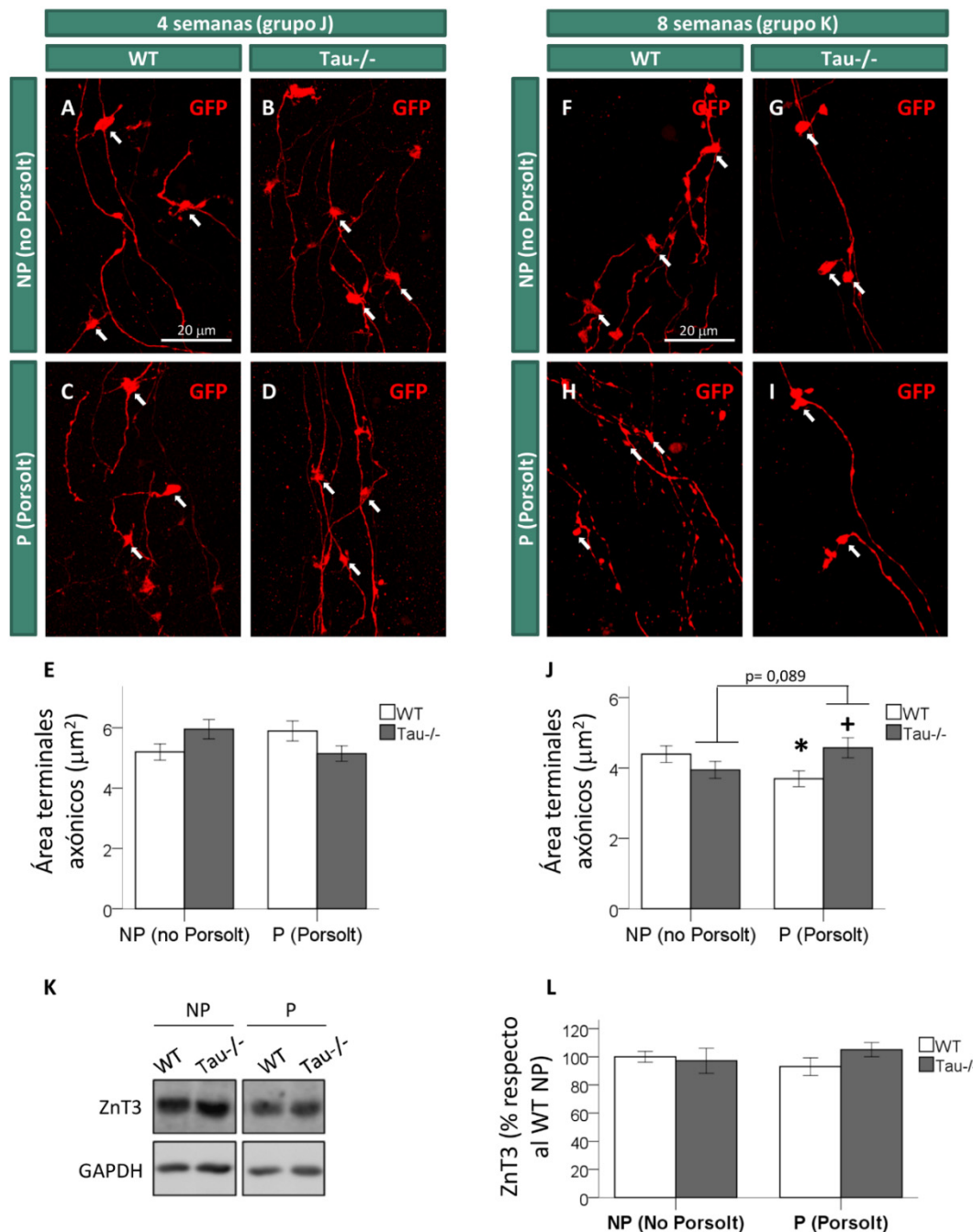


Figura 35. Efecto del estrés agudo en los axones de las neuronas granulares del DG de ratones WT y Tau-/-. (A-J) Análisis del área de los terminales axónicos en CA3 de neuronas de 4 (A-E) y 8 semanas de edad (F-J) infectadas con retrovirus PSD95-GFP en animales WT y Tau-/- sometidos (P) o no (NP) al test de Porsolt. (A-D) Imágenes representativas de la inmunofluorescencia (IF) de los terminales axónicos de neuronas de 4 semanas de edad. En rojo aparece la proteína GFP marcando los axones y los terminales axónicos. (E) Cuantificación del área de los terminales axónicos de neuronas de 4 semanas de edad en cada grupo experimental. El test de Porsolt no produce cambios significativos en el área de los terminales axónicos de las neuronas de 4 semanas de edad en ninguno de los dos genotipos. (F-I) Imágenes representativas de la IF de los terminales axónicos de neuronas de 8 semanas de edad. En rojo aparece la proteína GFP marcando los axones y los terminales axónicos. (J) Cuantificación del área de los terminales axónicos de neuronas de 8 semanas de edad en cada grupo experimental. El test de Porsolt disminuye el área de los terminales axónicos de las neuronas de 8 semanas de edad en los animales WT, pero no en los Tau-/. (K-L) Western Blot representativo (K) y cuantificación (L) de los niveles del marcador de fibras musgosas ZnT3 en el hipocampo de ratones WT y Tau-/- sometidos (P) o no (NP) al test de Porsolt. No se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos experimentales estudiados. Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al WT NP: *0,05 > p ≥ 0,01. Las cruces indican diferencias significativas respecto al WT P: +0,05 > p ≥ 0,01. Las flechas blancas indican terminales axónicos. Barras de escala 20 μm. NP: no Porsolt. P: Porsolt.

DISCUSIÓN

La proteína Tau desempeña un papel clave en la formación y maduración de las neuronas durante el desarrollo embrionario (Caceres y Kosik, 1990; Dawson *et al.*, 2001; Sapir *et al.*, 2012). En el ratón, tanto las isoformas mayoritarias como las modificaciones postraduccionales de Tau durante el desarrollo son diferentes a las que predominan en las neuronas maduras del cerebro adulto. Se ha demostrado que en las neuronas maduras aparecen fundamentalmente isoformas de Tau con 4 repeticiones en el dominio de unión a microtúbulos (Tau4R), mientras que durante su maduración predominan isoformas con 3 repeticiones (Tau3R) (Kosik *et al.*, 1989). Además, los niveles de fosforilación de Tau son más elevados durante el desarrollo embrionario que en el cerebro adulto en condiciones fisiológicas (Brion *et al.*, 1993). Tanto la presencia de únicamente 3 repeticiones como el hecho de que los niveles de fosforilación sean elevados confieren a la proteína Tau una menor afinidad por los microtúbulos, lo cual favorece su inestabilidad dinámica (Avila *et al.*, 2004; Conde y Caceres, 2009). En este sentido es interesante recordar que las formas de Tau que aparecen durante el desarrollo se asocian con procesos que requieren una gran plasticidad del citoesqueleto, como por ejemplo la adquisición de la polaridad neuronal (Goode y Feinstein, 1994; Avila *et al.*, 2004). Datos previos de éste y otros laboratorios han demostrado la presencia de Tau3R, así como niveles de fosforilación de Tau elevados, en las nuevas neuronas generadas en el hipocampo de ratones adultos (Bullmann *et al.*, 2007; Fuster-Matanzo *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010; Llorens-Martin *et al.*, 2012). Esto sugiere que la proteína Tau, además de estar implicada en el desarrollo neuronal embrionario, podría desempeñar también un papel en la neurogénesis hipocampal adulta. Además, diversas tauopatías se han relacionado con alteraciones en este proceso (Llorens-Martin *et al.*, 2011; Mu y Gage, 2011; Komuro *et al.*, 2015).

Con estos antecedentes, la presente tesis pretende profundizar en el estudio de la implicación de Tau en el proceso de neurogénesis hipocampal adulta. Para ello se ha utilizado uno de los modelos murinos deficientes en Tau más conocido (Dawson *et al.*, 2001). Además de caracterizar su papel en condiciones basales, y puesto que la neurogénesis adulta es ante todo un proceso plástico que permite la adaptación del individuo a los cambios del ambiente, se ha analizado también el papel de Tau en la regulación del proceso ante estímulos positivos y negativos.

1. La proteína Tau no influye en la tasa de neurogénesis hipocampal adulta en condiciones basales, pero está implicada en la maduración de las nuevas neuronas

La neurogénesis adulta es un proceso continuo que abarca desde la división de las células progenitoras en las regiones neurogénicas, hasta la integración funcional de las nuevas neuronas en los circuitos preexistentes, pasando por todos los estadios intermedios de diferenciación y maduración neuronal. A lo largo de este proceso, que en el hipocampo de roedores dura aproximadamente 8 semanas, muchas de las nuevas neuronas que se generan no son seleccionadas y mueren (Kempermann *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2008; Toni y Sultan, 2011). Así pues, la tasa de neurogénesis depende tanto de los niveles de proliferación y muerte celular, como de una adecuada diferenciación de las nuevas neuronas que les permita ser seleccionadas e integrarse en el circuito.

Con esta idea en mente, y siguiendo la secuencia de eventos que tienen lugar durante la neurogénesis hipocampal adulta, los primeros parámetros a tener en cuenta a la hora de evaluar la función de Tau en este proceso son la tasa de proliferación celular y el número de progenitores neuronales, neuroblastos y neuronas inmaduras presentes en el DG de los ratones deficientes en Tau.

Los resultados de esta tesis mostraron, en primer lugar, que la ausencia de Tau no produce alteraciones ni en el número de células en división ni en el número de progenitores neuronales presentes en la SGL del DG. Previamente se había descrito en un estudio con análogos de timidina que la ventana temporal de expresión de Tau3R durante la neurogénesis hipocampal adulta abarca desde los 3 hasta los 28 días de edad aproximadamente, con un pico máximo de células Tau3R positivas a los 14 días (Bullmann *et al.*, 2007). Este periodo de expresión coincide con la etapa en la que se produce la especificación y la maduración del axón y las dendritas (Hastings y Gould, 1999; Brandt *et al.*, 2003). Además, la expresión de Tau3R en neuronas inmaduras se confirmó mediante su colocalización con el marcador DCX, que identifica células que ya han adquirido identidad neuronal pero todavía no han completado su maduración (Bullmann *et al.*, 2007; Llorens-Martin *et al.*, 2012). Así pues, dado que la proteína Tau empieza a expresarse cuando las células ya han alcanzado el estadio de neurona inmadura, no resulta extraño que su ausencia no afecte a estadios previos.

Teniendo en cuenta lo anterior, cabría esperar que la proteína Tau estuviese implicada en el proceso de diferenciación una vez que las células ya han adquirido identidad neuronal. En

este sentido, en un estudio previo con otro modelo murino deficiente en Tau (Tucker *et al.*, 2001) se había descrito una disminución en el número de neuroblastos (Hong *et al.*, 2010). En nuestro modelo, sin embargo, la ausencia de Tau no produjo alteraciones en el número de células DCX y/o calretinina positivas, siendo ambos marcadores característicos de las etapas de neuroblasto y neurona inmadura respectivamente. Este resultado, aunque contradice lo descrito en el otro estudio, ya había sido demostrado con anterioridad en este mismo modelo (Fuster-Matanzo *et al.*, 2009) y, como ya ha sido sugerido previamente por otros grupos, puede ser atribuido a la posible compensación de la función de Tau por MAP1A en estas etapas iniciales de diferenciación (Harada *et al.*, 1994; Dawson *et al.*, 2001; Fujio *et al.*, 2007). Así pues, la función de Tau en la neurogénesis hipocampal adulta no parece ser esencial para la regulación del número de células que llegan a adquirir linaje neuronal. No obstante, se ha descrito que muchas de las células que llegan al estadio de neurona inmadura mueren durante el proceso de selección funcional que tiene lugar posteriormente durante su maduración (Ge *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2012). Es por ello que se ha señalado que la estimación de la tasa de neurogénesis adulta en función de la proliferación de los progenitores y del número de neuroblastos y neuronas inmaduras generados puede resultar incompleta (Kempermann *et al.*, 2003). Por este motivo, se analizaron también la tasa de muerte celular en el DG y la supervivencia de células de 1, 2, 4, 6 y 8 semanas de edad marcadas con análogos de timidina. El rango de edades estudiado, según la secuencia de diferenciación explicada en el apartado 1.5.2 de la Introducción, abarca todas las etapas de maduración morfológica y funcional de las nuevas neuronas. Puesto que no se encontraron alteraciones en ninguno de estos parámetros, y no se habían encontrado tampoco en los anteriores, se puede concluir que la proteína Tau no parece estar implicada en la regulación de la tasa de neurogénesis hipocampal adulta en condiciones basales. Sin embargo, aunque la compensación de la función de Tau por otras proteínas de unión a microtúbulos durante estas etapas madurativas haga que el número de las distintas poblaciones celulares no se vea afectado, no es posible descartar la existencia de alteraciones funcionales en las mismas que podrían condicionar su respuesta ante distintos estímulos, tal y como se discutirá más adelante.

Durante el desarrollo embrionario la función principal de Tau es la especificación y el mantenimiento del axón (Caceres y Kosik, 1990; Dawson *et al.*, 2001). En el hipocampo adulto, mediante la utilización de retrovirus GFP, se ha descrito la localización de Tau3R en los axones en desarrollo de las nuevas neuronas entre los 14 y los 21 días de edad (Llorens-Martin *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado la presencia tanto de Tau fosforilado como de Tau3R también en las dendritas de estas neuronas inmaduras (Fuster-Matanzo *et al.*, 2009; Llorens-Martin *et al.*, 2012). Así pues, dada la localización y el estadio de desarrollo en el que se expresa Tau3R, cabe la posibilidad de que la función de Tau en la neurogénesis adulta esté relacionada con la maduración

morfológica de las nuevas neuronas. Con el objetivo de profundizar en el estudio de esta hipótesis, se analizó la morfología de nuevas neuronas marcadas con retrovirus PSD95-GFP en los ratones deficientes en Tau. Los resultados mostraron que, en ausencia de Tau, se produce una disminución en la longitud y ramificación dendrítica a las 4 semanas de edad. A las 8 semanas de edad, sin embargo, estas diferencias desaparecen. Así pues, se podría concluir que la ausencia de Tau produce un retraso transitorio en la maduración del árbol dendrítico de las nuevas neuronas que finalmente se normaliza al alcanzar el final del proceso de maduración morfológica a las 8 semanas (Kempermann *et al.*, 2004; Ge *et al.*, 2008; Toni y Sultan, 2011). En relación a esto es interesante destacar que este mismo retraso en la maduración dendrítica ya había sido descrito previamente en un estudio *in vivo* en el que se eliminaba la expresión de Tau en las neuronas embrionarias mediante electroporación *in utero* con RNAs de interferencia (Sapir *et al.*, 2012). Así pues, aunque Tau es una MAP asociada principalmente a los microtúbulos del axón, parece que su ausencia tiene consecuencias también en el desarrollo de las dendritas, algo que ocurre tanto en la neurogénesis embrionaria como en la adulta. Puesto que durante el desarrollo la isoforma de Tau que se expresa mayoritariamente es Tau3R, que como se ha comentado anteriormente tiene menor afinidad por los microtúbulos y favorece la inestabilidad dinámica del citoesqueleto, podría ser posible que este retraso en la maduración dendrítica se debiera a una plasticidad insuficiente del citoesqueleto durante la dendritogénesis.

Aunque hayan completado su maduración morfológica, las nuevas neuronas no llegan a ser totalmente indistinguibles del resto de neuronas granulares del DG hasta que han completado también su maduración funcional (Couillard-Despres *et al.*, 2006). Este proceso, que consiste en el correcto establecimiento de contactos sinápticos aferentes y eferentes, se completa entre las 4 y las 8 semanas de edad (Toni y Sultan, 2011). En este rango de edades, según lo descrito previamente, la expresión de Tau3R ya habrá sido paulatinamente sustituida por la de Tau4R, que es la que permanecerá durante el resto de la vida de la neurona (Bullmann *et al.*, 2007; Llorens-Martin *et al.*, 2012). Las isoformas Tau4R tienen una mayor afinidad por los microtúbulos que las isoformas Tau3R, lo cual quiere decir que la función de Tau en esta etapa podría estar más relacionada con el mantenimiento estructural del citoesqueleto que con la plasticidad del mismo.

Con el objetivo de abordar el estudio del efecto de la ausencia de tau sobre la conectividad de las nuevas neuronas, analizamos en primer lugar el establecimiento de contactos sinápticos aferentes en sus dendritas. Como se ha detallado en la Introducción, la proteína PSD95 es uno de los componentes principales de las PSDs que se forman en las dendritas de las neuronas granulares del hipocampo (Sheng y Hoogenraad, 2007). Estas PSDs son las encargadas de recibir las aferencias glutamatérgicas provenientes de la corteza entorrinal, que es considerada la fuente

principal de aferencias del DG en el circuito trisináptico. El análisis del número de PSDs de las neuronas marcadas con los retrovirus PSD95-GFP reveló la existencia de una reducción selectiva del número de contactos sinápticos en las dendritas distales (5º orden de ramificación) de las neuronas de 8 semanas de edad de los animales Tau^{-/-} en comparación con los animales WT. Por otro lado, el análisis del área de las PSDs reveló la existencia de pequeños aumentos en el área de las mismas en algunos órdenes de ramificación dendrítica a las 4 semanas de edad, así como un incremento generalizado a las 8 semanas de edad. Como excepción a lo anterior cabe destacar la reducción en el área de las PSDs localizadas en el 5º orden de ramificación del árbol dendrítico de las neuronas de 8 semanas de edad de los animales Tau^{-/-}, región en la que, además, se producía una reducción en el número de dichos contactos sinápticos. Estos datos indican que la ausencia de Tau reduce específicamente la conectividad en las zonas distales del árbol dendrítico, que además son las que reciben la mayor parte de las aferencias de la corteza entorrinal (Kharatishvili *et al.*, 2006). Esta función específica de la proteína Tau en la maduración sináptica glutamatérgica podría tener que ver con su implicación en el tráfico intracelular de proteínas, y más concretamente con el tráfico de la quinasa Fyn. La interacción entre Tau y Fyn, así como el papel de Tau en la localización de Fyn en las PSDs, ya habían sido previamente descritos (Lee *et al.*, 1998; Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2012). La quinasa Fyn es la encargada de llevar a cabo la fosforilación de la subunidad NR2b de los receptores de glutamato tipo NMDA. Esta fosforilación refuerza la interacción de los receptores con la proteína PSD95, siendo dicha interacción lo que facilita su anclaje a la PSD, con el consiguiente refuerzo de la sinapsis (Ittner *et al.*, 2010; Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2012). Así pues, sería posible que en ausencia de Tau las sinapsis glutamatérgicas de las nuevas neuronas fuesen más débiles y menos funcionales. De hecho, en un estudio reciente ha sido descrito que la ausencia de Tau disminuye la hiperexcitabilidad neuronal en varios modelos de epilepsia en los que se producen convulsiones espontáneas en ausencia de un estímulo desencadenante (Holth *et al.*, 2013). Para comprobar si los defectos encontrados en la maduración sináptica de las nuevas neuronas debidos a la ausencia de Tau podrían deberse a un defecto en la localización de Fyn, analizamos mediante WB los niveles de NR2b y NR2b fosforilado en Y1472, que es el residuo fosforilado por Fyn, en el hipocampo de los ratones WT y Tau^{-/-}. Los resultados mostraron un descenso en los niveles de NR2b fosforilado en ausencia de Tau, lo cual apoya la hipótesis de la deslocalización de Fyn. De hecho, el descenso en la fosforilación de NR2b en ausencia de Tau ya había sido previamente descrito en extractos murinos de cerebro total (Ittner *et al.*, 2010). Los niveles de proteína NR2b total, por su parte, resultaron estar aumentados en el hipocampo de los ratones Tau^{-/-}. Este aumento en los niveles de NR2b, al contrario de lo que ocurriría con el descenso de NR2b fosforilado, parece ser un efecto específico del hipocampo (Ittner *et al.*, 2010; Ahmed *et al.*, 2014), lo cual podría atribuirse al incremento del

área de las PSDs en las regiones proximales y medias del árbol dendrítico de las neuronas procedentes de la neurogénesis adulta. Sin embargo, la posibilidad de que otras poblaciones neuronales contribuyan a dicho aumento en los niveles totales de NR2B no puede ser descartada.

A continuación, con el objetivo de determinar si estas alteraciones en las PSDs de los animales Tau-/- iban acompañadas de cambios en la señalización aferente que llega al DG, decidimos analizar mediante inmunofluorescencia el área ocupada por terminales glutamatérgicos (vGLUT-1 positivos) y GABAérgicos (GAD-65 positivos) en la capa molecular, que es donde se sitúan las dendritas de las neuronas granulares. Los resultados mostraron, en primer lugar, un aumento de señalización glutamatérgica en la capa molecular media (MML), lo cual podría estar relacionado con el mayor tamaño de las PSDs. En segundo lugar, se observó un aumento de señalización GABAérgica en la capa molecular media (MML) y externa (EML). La composición de las sinapsis GABAérgicas es diferente a la de las glutamatérgicas, y no incluye a la proteína PSD95, con lo cual este aumento no parecería estar relacionado, *a priori*, con las PSDs analizadas. En relación a esto es interesante destacar que el GABA induce la despolarización de las nuevas neuronas durante su desarrollo y ejerce funciones tróficas sobre las mismas (Jagasia *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2012; Waterhouse *et al.*, 2012; Chancey *et al.*, 2013; Quadrato *et al.*, 2014). En este sentido, se ha demostrado que el factor neurotrófico BDNF ejerce parte de sus acciones estimuladoras sobre los precursores neurales en el hipocampo mediante una potenciación de la señalización GABAérgica (Waterhouse *et al.*, 2012). Por todo ello, podría concluirse que el aumento observado en los niveles de GAD-65 podría estar relacionado con un posible mecanismo compensatorio encaminado a contrarrestar los posibles efectos de la ausencia de Tau. Asimismo, este incremento en los niveles de GAD-65 podría estar relacionado con los efectos neuroprotectores de la ausencia de Tau demostrados por otros grupos de investigación y por nuestros propios resultados, tal y como se comentará más adelante en este apartado de Discusión.

Como se ha discutido anteriormente, las nuevas neuronas han de integrarse funcionalmente en el circuito trisináptico para completar su proceso madurativo y ser seleccionadas para su supervivencia. Otra parte fundamental de dicho proceso, además del establecimiento de sinapsis aferentes, consiste en el establecimiento de sinapsis con sus células diana, las neuronas piramidales de CA3. Ha sido descrito que los primeros terminales axónicos provenientes de las nuevas neuronas granulares aparecen en CA3 a los 10-11 días de edad celular (Zhao *et al.*, 2006). Nuestros resultados mostraron que la ausencia de Tau no produce alteraciones en el área de los terminales axónicos de las nuevas neuronas ni a las 4 ni a las 8 semanas de edad. En relación a esto es interesante destacar que en un estudio reciente se describió, utilizando microscopía electrónica, que los terminales axónicos de las neuronas granulares en CA3 de los

animales deficientes en Tau son más grandes que en los WT (Decker *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que las células analizadas mediante técnicas de microscopía electrónica corresponden en su mayor parte a neuronas maduras procedentes del desarrollo embrionario, estos datos podrían indicar que el papel de Tau en los terminales axónicos es diferente en las neuronas procedentes de neurogénesis adulta y embrionaria. Sin embargo, en nuestro caso tampoco se encontraron diferencias significativas en la cuantificación mediante WB de diferentes proteínas presinápticas en extractos de hipocampo, y el diámetro de las fibras musgosas no se vio modificado por la ausencia de Tau. De todo ello puede concluirse que la falta de Tau no parece producir alteraciones morfológicas en los axones de las neuronas granulares, aunque dada la importancia de la proteína Tau en el axón no pueden descartarse alteraciones funcionales. Nuevamente, la compensación de la función de Tau por parte de otras proteínas de unión a microtúbulos podría ser la clave de la falta de efectos observados en condiciones basales.

En resumen, la ausencia de Tau en las nuevas neuronas granulares del DG produce un retraso en la maduración morfológica de su árbol dendrítico y alteraciones en sus PSDs, pero no afecta a la morfología de los terminales presinápticos que se forman en CA3. Sin embargo, si la integración de las nuevas neuronas no fuera adecuada, cabría esperar cambios en el comportamiento de los animales en aquellas tareas íntimamente relacionadas con el DG del hipocampo, y en particular con las nuevas neuronas granulares.

En ese sentido, es sabido que el hipocampo está involucrado en procesos de memoria y aprendizaje (van Praag *et al.*, 2000; Shors *et al.*, 2001; Aimone *et al.*, 2006; Dupret *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008). En concreto, ha sido demostrado que las nuevas neuronas granulares están relacionadas con el proceso de “*behavioral pattern separation*”, que consiste en la capacidad de diferenciar dos contextos muy similares (Deng *et al.*, 2010; Aimone *et al.*, 2011; Sahay *et al.*, 2011). Con el fin de comprobar si las alteraciones descritas en la maduración de las nuevas neuronas podrían estar relacionadas con alteraciones en este comportamiento, se sometió a los ratones en primer lugar al “*Novel Location Preference Test*”. Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias entre los animales Tau-/- y los WT, de lo que se deduce que las alteraciones morfológicas en las nuevas neuronas derivadas de la ausencia de Tau no tienen consecuencias en la adquisición de este tipo de memoria, al menos a la edad a la que fueron evaluados estos animales. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente para otras funciones cognitivas en este mismo modelo, ya que se había descrito que los ratones Tau-/- jóvenes tampoco presentan déficits de aprendizaje en el “*Morris Water Maze Test*” (MWM) (Roberson *et al.*, 2007; Gomez de Barreda *et al.*, 2010). Sin embargo, utilizando una versión modificada de este test (“*reversal MWM*”), se ha demostrado recientemente que, aunque no muestren alteraciones en la

fase de adquisición, estos ratones sí presentan un déficit en la plasticidad de aprendizaje cuando la plataforma es cambiada a una nueva localización (Regan *et al.*, 2015). En el modelo deficiente en Tau de Tucker y colaboradores, por otra parte, se había observado una mejora en el aprendizaje en una versión extendida del MWM (Ahmed *et al.*, 2014). En resumen, nuestros datos apuntan a que la ausencia de Tau no produce alteraciones en el “*behavioral pattern separation*” en ratones jóvenes, lo cual concuerda con los datos obtenidos por otros grupos que indican una ausencia general de alteraciones en los procesos de adquisición de memoria dependientes del hipocampo. Tan sólo tareas muy restrictivas como la plasticidad de aprendizaje podrían poner de manifiesto las posibles diferencias funcionales que la ausencia de Tau pudiera producir, mientras que tareas menos complejas parece que pueden ser realizadas con normalidad por los ratones jóvenes en ausencia de Tau. Sin embargo, cabe destacar que sí se han descrito déficits cognitivos asociados al envejecimiento en los ratones deficientes en Tau, los cuales empiezan a aparecer a partir de los 20 meses de edad (Ma *et al.*, 2014).

Por otra parte, se ha descrito que el hipocampo, y en concreto la neurogénesis hipocampal adulta, están relacionados con comportamientos de tipo emocional como la depresión (Sahay y Hen, 2008; David *et al.*, 2009) o la ansiedad (Meshi *et al.*, 2006). Así pues, decidimos evaluar el efecto de la ausencia de Tau sobre estos comportamientos mediante el test de Porsolt (utilizado para analizar comportamientos de tipo depresivo) y mediante el “*Elevated Plus Maze Test*” (EPM) (utilizado para analizar comportamientos de tipo ansiedad). El análisis de los resultados no mostró alteraciones en el tiempo de inmovilidad de los ratones Tau-/- en el test de Porsolt, lo cual indica que no sufren alteraciones de tipo depresivo. Sí se encontró, no obstante, una reducción en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos del EPM, lo cual indica un mayor grado de ansiedad. Este efecto ansiogénico de la ausencia de Tau ya había sido descrito anteriormente en este mismo modelo, medido como disminución de actividad exploratoria en el “*Open Field Test*” (Morris *et al.*, 2011). Sin embargo, en el modelo deficiente en Tau de Tucker y colaboradores no encontraron alteraciones ni en la actividad exploratoria en el “*Open Field Test*”, ni en la exploración de los brazos abiertos del EPM (Ahmed *et al.*, 2014). La disparidad en los resultados relativos al efecto de la ausencia de Tau sobre el comportamiento de los animales en los distintos modelos deficientes en Tau es frecuente, pero recientemente se ha sugerido que probablemente sea debido a los diferentes fondos genéticos utilizados en su generación (Lei *et al.*, 2014). Por otra parte, en un modelo animal de sobreexpresión de una forma patológica de Tau en los precursores neuronales, se describió un fenotipo ansiogénico en el EPM y ausencia de alteraciones en el test de Porsolt (Pristera *et al.*, 2013), lo cual concuerda con nuestros resultados y apoya la hipótesis de que la alteración de Tau incrementa el comportamiento tipo ansiedad en los ratones.

En resumen, la ausencia de proteína Tau no altera la tasa de neurogénesis hipocampal adulta. Sin embargo, retrasa la maduración morfológica del árbol dendrítico de las nuevas neuronas y produce alteraciones en sus PSDs. Estas alteraciones, no obstante, no se ven reflejadas en diferencias comportamentales de tipo cognitivo, aunque sí aparecen alteraciones emocionales relacionadas con un aumento de ansiedad.

2. La proteína Tau está implicada en la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta en respuesta al enriquecimiento ambiental

El EA se definió originalmente como la estabulación de los animales en unas condiciones que favorecieran su interacción social, estimularan su plasticidad cerebral y mejoraran sus habilidades cognitivas y sensorimotoras (Rosenzweig, 1966). Años más tarde se demostró que es un potente modulador positivo de la neurogénesis hipocampal adulta (Kempermann *et al.*, 1997), y hoy en día es la aproximación no invasiva más utilizada experimentalmente con este fin. Sin embargo, es importante tener en cuenta, a la hora de diseñar los experimentos, que los efectos concretos producidos por el enriquecimiento ambiental pueden variar en función de su duración, sexo y edad de los animales, así como de las características del protocolo utilizado (Martinez-Cue *et al.*, 2002; Leger *et al.*, 2014).

El protocolo de EA utilizado en esta tesis consistió en una mezcla de estimulación cognitiva, interacción social y ejercicio físico previamente descrito (Martinez-Cue *et al.*, 2005; Llorens-Martin *et al.*, 2007). Los animales se mantuvieron en este ambiente durante 8 semanas, lo cual supera el tiempo mínimo descrito para inducir incrementos en la supervivencia neuronal (Leger *et al.*, 2014). Tal y como ha sido publicado, el EA no produjo cambios en la proliferación de los precursores neuronales en los animales WT (Kempermann *et al.*, 1997; van Praag *et al.*, 1999b; Kronenberg *et al.*, 2003; Llorens-Martin *et al.*, 2010; Leger *et al.*, 2014) ni tampoco en los Tau -/-. Sin embargo, todos los animales sometidos a EA mostraron un incremento en el número de neuroblastos (células DCX positivas) en comparación con los animales estabulados en condiciones control (EC), tal y como ha sido reportado de manera consistente en la bibliografía (Kempermann *et al.*, 1997; van Praag *et al.*, 1999b; Kronenberg *et al.*, 2003). Asimismo, el EA produjo un incremento en la supervivencia celular a 1 semana de edad en ambos genotipos. No obstante, cabe destacar que en la población de neuronas maduras de 8 semanas de edad, este incremento en la supervivencia fue significativamente menor en los animales deficientes en Tau en comparación con el producido en los WT. Además, de forma complementaria al aumento de supervivencia, el

EA produjo un descenso en la tasa de muerte celular que resultó ser también menor en los animales Tau^{-/-}. Analizados en conjunto, estos resultados sugieren que la proteína Tau parece estar implicada en el aumento de supervivencia provocado por el EA en neuronas maduras. Sin embargo, ya que los efectos del EA sobre el número de neuroblastos y de neuronas de una semana de edad son similares en los animales WT y Tau^{-/-}, podría concluirse que Tau no está implicada en la regulación que el EA ejerce sobre estas poblaciones celulares más inmaduras.

El mecanismo específico por el que la proteína Tau puede influir en la regulación de la supervivencia inducida por el EA se desconoce. Se ha propuesto que el incremento en la tasa de neurogénesis adulta producido por el EA se debe tanto a una aceleración del proceso de diferenciación neuronal (Kronenberg *et al.*, 2003; Leger *et al.*, 2014) como a un mayor reclutamiento de neuronas durante el proceso de selección funcional (Kempermann *et al.*, 1997; Kronenberg *et al.*, 2003). Puesto que la proteína Tau no parece estar implicada en la diferenciación neuronal durante la neurogénesis adulta, cabe pensar que ejerza su acción durante el reclutamiento funcional de las nuevas neuronas (lo cual además puede ser sugerido a la vista de las alteraciones en las PSDs observadas en los ratones Tau^{-/-}). Además, el hecho de que el proceso de selección funcional tenga lugar entre las 2 y las 3 semanas de edad (Toni y Sultan, 2011) podría explicar por qué la ausencia de Tau no produce diferencias en el efecto del EA en células más jóvenes.

Se ha descrito que el EA induce incrementos en los niveles de factores de crecimiento tales como BDNF, NGF (*nerve growth factor*), NT-3 (*neurotrophin-3*) o GDNF (*glial cell derived neurotrophic factor*) (van Praag *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2013), y que parte de los mecanismos pro-neurogénicos del EA podrían estar mediados por éstos y otros factores tróficos. Los mecanismos concretos mediante los cuales lo hacen no se conocen en profundidad, pero se ha sugerido que todos ellos podrían en último término provocar un aumento en la expresión y/o activación de receptores glutamatérgicos (Hu *et al.*, 2013). De hecho, se ha demostrado que el EA induce un incremento en la expresión de receptores de glutamato NMDA tipo 1 (NR1) en el hipocampo (Hu *et al.*, 2013). La señalización glutamatérgica está íntimamente relacionada con la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta, y los receptores NR1, concretamente, parecen ser esenciales en el proceso de selección funcional de las nuevas neuronas (Tashiro *et al.*, 2006; Ge *et al.*, 2008). Aunque la implicación de Tau en estas cascadas de señalización se desconoce casi completamente, se ha descrito que el EA disminuye la actividad de GSK3 β a través de la activación de la vía PI3K/AKT mediada por BDNF, y que esta reducción en la actividad de GSK3 β se traduce en una menor fosforilación de Tau (Hu *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2013). Se ha sugerido que la disminución en los niveles de Tau fosforilado, junto con un aumento en la expresión de la proteína motora

kinesina-1, podría contribuir a los efectos proneurogénicos del EA facilitando el transporte axonal anterógrado de moléculas como, por ejemplo, los receptores glutamatérgicos (Hu *et al.*, 2010). Así pues, podría ser que el menor incremento de supervivencia encontrado en los ratones Tau^{-/-} se deba a la imposibilidad de mejorar el transporte axonal cuando es requerido.

Además del glutamato, otro neurotransmisor principal en la regulación de la maduración de las nuevas neuronas es el GABA. De hecho, los receptores GABAérgicos son los primeros en expresarse durante el proceso de diferenciación neuronal, antes incluso de que se establezcan las primeras conexiones sinápticas (Ge *et al.*, 2008; Toni y Sultan, 2011). En esta etapa temprana, la señalización GABAérgica es despolarizante, pasando a ser hiperpolarizante más o menos durante la etapa de selección funcional de las nuevas neuronas. Es por ello que se ha sugerido que el GABA podría cooperar con el glutamato en este proceso (Ge *et al.*, 2008). A este respecto es interesante destacar que el EA en nuestro caso produjo un incremento en la neurotransmisión GABAérgica que fue menos acusado en los ratones Tau^{-/-} que en los WT, lo cual podría haber contribuido también a una menor eficacia en el reclutamiento funcional de las nuevas neuronas. Además, tal y como ha sido demostrado, el BDNF parece ejercer parte de sus efectos neurotróficos mediante una potenciación de la neurotransmisión GABAérgica en las nuevas neuronas granulares (Waterhouse *et al.*, 2012). Como se ha comentado anteriormente, es sabido que el EA incrementa, entre otros, los niveles de BDNF. Cabe pensar, por tanto, que el incremento en la señalización GABAérgica descrito en esta tesis como consecuencia de 8 semanas de EA podría ser el mecanismo efector del incremento en los niveles de BDNF ampliamente descrito, contribuyendo a la manifestación de dichos efectos pro-neurogénicos.

En resumen, parece que en ausencia de Tau las nuevas neuronas son menos sensibles a los efectos pro-neurogénicos del EA. Datos previos de otros grupos de investigación han mostrado cómo el EA incrementa la longitud y ramificación dendrítica en diversas regiones del cerebro (revisado en (van Praag *et al.*, 2000)). Por lo tanto, nos propusimos evaluar si dichos efectos estimuladores tenían lugar en ausencia de Tau. Los resultados de los análisis morfométricos de neuronas de 8 semanas de edad infectadas con retrovirus PSD95-GFP mostraron que el EA produjo un aumento en la longitud y en la ramificación del árbol dendrítico en los animales WT, pero no en los Tau^{-/-}. Así pues, parece que las neuronas deficientes en Tau son incapaces de adaptar su morfología a la mayor demanda de actividad producida por el EA. Podría ser posible que, al igual que se proponía en condiciones basales, esto se deba a una plasticidad insuficiente del citoesqueleto durante la formación de las dendritas.

Otro de los efectos más llamativos del EA sobre las neuronas granulares es la inducción de la sinaptogénesis (van Praag *et al.*, 2000; Llorens-Martin *et al.*, 2013). Las modificaciones en las

sinapsis en respuesta a la demanda de actividad son una de las manifestaciones de lo que se conoce como metaplasticidad sináptica, que consiste, de manera resumida, en la capacidad de la neurona de reforzar o debilitar la eficiencia de sus conexiones sinápticas en función de la actividad que reciben. El debilitamiento de las sinapsis que no reciben suficiente activación se conoce como *long term depression* (LTD), mientras que el refuerzo de aquellas sinapsis que están siendo más activadas se denomina *long term potentiation* (LTP) (Liu *et al.*, 2004). Ambos procesos son necesarios para una adecuada adaptación de la neurona a los diferentes estímulos que va recibiendo. Es razonable pensar que la enorme demanda de procesamiento de información que supone el EA requiera una gran plasticidad sináptica por parte de las neuronas encargadas de procesar dicha información, por lo que sería esperable una elevada tasa de recambio de sinapsis en las neuronas de los animales sometidos al mismo (van Praag *et al.*, 2000; Foster y Dumas, 2001; Nimchinsky *et al.*, 2002; Sale *et al.*, 2009; Llorens-Martin *et al.*, 2013). En nuestro caso, el análisis de las neuronas infectadas con retrovirus PSD95-GFP reveló, a grandes rasgos, un aumento en la densidad de PSDs en las dendritas proximales y una disminución de su tamaño en las dendritas distales en los ratones WT tras el EA. En los animales Tau^{-/-}, sin embargo, el EA produjo un descenso en el número de PSDs en las dendritas de 5º orden, junto con una disminución general de su tamaño en todo el árbol dendrítico. El aumento en la densidad de PSDs en las nuevas neuronas granulares en respuesta al EA, así como la disminución de su tamaño en los animales WT, ya habían sido previamente descritos (Llorens-Martin *et al.*, 2013). Se ha propuesto que ello es debido a que las nuevas PSDs generadas como consecuencia del EA, todavía inmaduras, son de menor tamaño que las preexistentes. Aunque el EA también produce una disminución en el tamaño de las PSDs en los animales Tau^{-/-} (lo cual podría indicar que se están formando nuevos contactos sinápticos), la reducción en el número de PSDs que tiene lugar en las dendritas de 5º orden en respuesta a EA podría indicar una respuesta defectiva de dichas neuronas a los efectos estimuladores del EA. Esta reducción en el número de PSDs en las dendritas distales resulta especialmente interesante porque, como se comentaba anteriormente, estas dendritas son las que reciben la mayor parte de las aferencias procedentes de la corteza entorrinal, y, de hecho, el número de PSDs en esta zona ya se encontraba disminuido en condiciones basales debido a la ausencia de Tau. Así pues, parece que las alteraciones en la formación de las PSDs debidas a la ausencia de Tau son aún más acusadas cuanto mayor es la demanda de actividad a la que están sometidas, lo cual podría indicar deficiencias en la estabilización de las nuevas PSDs. De hecho, en un estudio reciente se ha demostrado que la LTP, que está íntimamente relacionada con el proceso de estabilización de las sinapsis, se encuentra disminuida en el modelo murino deficiente en Tau de Tucker y colaboradores (Ahmed *et al.*, 2014). El papel concreto que desempeña la proteína Tau en la estabilización de estas sinapsis está todavía por determinar, pero, como se ha comentado

anteriormente, podría tener que ver con su interacción con el complejo PSD95/NMDAR/Fyn (Mondragon-Rodriguez *et al.*, 2012). Por otra parte, la contribución de Tau a la LTD, relacionada con el debilitamiento de las sinapsis con poca actividad, ha sido demostrada en dos estudios independientes (Kimura *et al.*, 2014; Regan *et al.*, 2015). En el estudio de Regan y colaboradores, concretamente, describieron que Tau es necesaria para la internalización de los receptores AMPA de glutamato que tiene lugar durante este proceso. En relación a esto es interesante destacar que se ha demostrado que GSK-3 β , que como se ha comentado anteriormente es una de las principales quinasas encargadas de la fosforilación de Tau, también participa en la internalización de los receptores AMPA y contribuye con ello a los procesos de LTD (Arendt, 2003).

Por último, aunque la sinaptogénesis en las dendritas de las neuronas granulares es el evento más estudiado en relación a las modificaciones morfológicas y funcionales provocadas por el EA, la transmisión de la información depende también de la plasticidad de los terminales axónicos presinápticos en CA3. Consecuentemente con lo que cabría esperar tras un aumento en la demanda de actividad, el tamaño medio de los terminales axónicos de las neuronas de 8 semanas de edad se vio aumentado en los animales WT tras el EA. En los animales Tau^{-/-}, sin embargo, este efecto no se produjo. Aunque parezca paradójico dada su localización mayoritariamente axonal, el papel de Tau en las estructuras presinápticas está mucho menos estudiado que en las postsinápticas. Como comentábamos anteriormente, la ausencia de Tau en los terminales axónicos de las nuevas neuronas no parece inducir cambios morfológicos apreciables en condiciones basales. Sin embargo, el hecho de que su ausencia condicione la aparición de los efectos estimuladores del EA plantea la posibilidad de que Tau sea relevante en la adaptación de estas estructuras a los cambios en el ambiente.

En resumen, la ausencia de proteína Tau atenúa los efectos estimuladores del EA sobre la supervivencia, la dendritogénesis y la morfología de los contactos sinápticos de las nuevas neuronas que ya han completado su proceso de maduración.

3. La proteína Tau está implicada en la regulación de la neurogénesis hipocampal adulta en condiciones de estrés agudo

El estudio de la neurogénesis adulta en condiciones patológicas es el campo que ha acaparado más atención desde su descubrimiento. La capacidad de renovación del cerebro plantea un nuevo campo de estrategias terapéuticas, pero para conocerlo en profundidad es necesario conocer cómo se regula este proceso en respuesta a estímulos deletéreos. En este

sentido, uno de los reguladores negativos de la neurogénesis hipocampal adulta más estudiados es el estrés (Gould *et al.*, 1992; Cameron *et al.*, 1993a; Gould *et al.*, 1997; Cameron *et al.*, 1998; Tanapat *et al.*, 2001).

Como hemos visto anteriormente, la proteína Tau interviene de manera crucial en la modulación de la neurogénesis que tiene lugar frente a estímulos moduladores positivos tales como el EA. Así pues, con estos datos nos planteamos la posibilidad de que Tau estuviese también implicada en la regulación negativa de la neurogénesis hipocampal adulta, y para evaluarlo utilizamos el test de Porsolt como forma no invasiva de inducción de estrés agudo.

Los resultados mostraron, en primer lugar, que el estrés inducido por el test de Porsolt causó una disminución de la supervivencia de las células a todas las edades estudiadas (1, 4 y 8 semanas de edad) en ambos genotipos. No obstante, esta disminución fue significativamente menos acusada en las células de 1 y 4 semanas de edad en los ratones deficientes en Tau, lo cual indica que en este rango de edades la ausencia de Tau confiere una cierta neuroprotección a dichas subpoblaciones. El efecto del Porsolt sobre la supervivencia de las nuevas neuronas hipocampales de 1 semana de edad en animales WT ya había sido descrito previamente (Llorens-Martin y Trejo, 2011). Por lo tanto, parece que la ausencia de Tau confiere una neuroprotección parcial específicamente en las neuronas que aún no han completado su proceso de maduración, y que se ha sugerido que podrían ser más susceptibles a los efectos del Porsolt. Como se ha comentado en la Introducción, las nuevas neuronas granulares inmaduras poseen un menor umbral de activación y una mayor plasticidad sináptica que el resto de las neuronas granulares del DG (Schmidt-Hieber *et al.*, 2004; Ge *et al.*, 2008). En condiciones fisiológicas estas características suponen la base de funciones tales como el “behavioral pattern separation” (Deng *et al.*, 2010; Aimone *et al.*, 2011; Sahay *et al.*, 2011), pero en condiciones patológicas esta elevada sensibilidad a los estímulos externos las puede volver más vulnerables (Llorens-Martin y Trejo, 2011). De hecho, el análisis de la tasa de muerte general en el DG no resultó aumentado en ninguno de los dos genotipos tras el Porsolt, lo cual indica que el estrés afectó fundamentalmente a una población de neuronas muy concreta. Esta ausencia de muerte apoptótica masiva, por otra parte, ya había sido descrita previamente en otros estudios sobre los efectos del estrés (Leverenz *et al.*, 1999; Sousa y Almeida, 2002; Czeh y Lucassen, 2007; Llorens-Martin y Trejo, 2011).

A la vista de los resultados anteriores, decidimos estudiar a continuación si la ausencia de Tau, además de ser beneficiosa para la supervivencia neuronal en condiciones de estrés, podría contribuir también a evitar alteraciones en su morfología y en su conectividad. Los resultados mostraron que, en animales WT, el estrés producido por el test de Porsolt provoca alteraciones en la ramificación del árbol dendrítico y una disminución de su longitud a las 8 semanas de edad,

pero no a las 4. En los animales Tau^{-/-}, sin embargo, estas alteraciones no tuvieron lugar. Es más, en las neuronas de 4 semanas de edad, que en condiciones basales presentaban un retraso en su maduración dendrítica, se produjo un efecto estimulador que situó su nivel de ramificación en valores similares a los WT. Dado que los valores mostrados son una media de todas las neuronas analizadas, no se puede descartar que las alteraciones observadas se deban a una muerte selectiva de determinados grupos de neuronas. Así, el aumento en la complejidad del árbol dendrítico de las neuronas inmaduras de los animales Tau^{-/-} podría deberse a una muerte selectiva de las neuronas menos desarrolladas. El descenso en la complejidad dendrítica de las neuronas maduras en los animales WT, por su parte, podría estar asociado a la muerte preferente de neuronas muy desarrolladas con muchos receptores NMDA, y por tanto más sensibles a la excitotoxicidad glutamatérgica. La muerte por excitotoxicidad glutamatérgica, como se discutirá en detalle más adelante, está íntimamente relacionada con los efectos del estrés agudo y con la neuroprotección conferida por la ausencia de Tau. Sin embargo, tampoco podrían descartarse cambios en la morfología del árbol dendrítico de estas nuevas neuronas granulares tras el test de Porsolt, lo cual también explicaría las diferencias encontradas.

En cuanto a las conexiones sinápticas de las nuevas neuronas, se observó que la ausencia de Tau atenúa las alteraciones provocadas por el estrés tanto en las PSDs (reducción de su densidad) como en los terminales axónicos (reducción de su tamaño). El efecto del estrés sobre las PSDs resultó ser más acusado cuanto más madura era la neurona, y tanto a las 4 como a las 8 semanas de edad la ausencia de Tau confirió sólo una neuroprotección parcial, ya que en ambos casos se dio un descenso local en la densidad de PSDs en las dendritas de 4^º orden. En el caso de los terminales axónicos, sin embargo, la neuroprotección por ausencia de Tau en las neuronas de 8 semanas de edad (que son las que sufren afectación en los terminales axónicos tras el Porsolt) fue total, no encontrándose reducciones en su tamaño derivadas del estrés. De hecho, la tendencia de los terminales axónicos deficientes en Tau tras el test de Porsolt fue a hacerse más grandes, lo cual podría sugerir la existencia de algún tipo de mecanismo de compensación ante los daños sufridos en las PSDs.

Los mecanismos mediante los cuales el estrés agudo disminuye la tasa de neurogénesis hipocampal adulta no están del todo definidos, pero parece que el desencadenante principal es el aumento en los niveles de glucocorticoides derivado de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (revisado en [Kempermann, 2006](#)). Se ha descrito que la exposición aguda a niveles elevados de glucocorticoides impide la diferenciación de las nuevas neuronas granulares ([Wong y Herbert, 2006](#)), y el tratamiento con antagonistas de sus receptores previene la muerte producida por el estrés agudo derivado del test de Porsolt ([Llorens-Martin y Trejo, 2011](#)).

Además, se ha demostrado que los efectos negativos de los glucocorticoides sobre la neurogénesis adulta son dependientes de la actividad de los receptores NMDA (Cameron *et al.*, 1998; Kempermann, 2006). Esta relación entre el estrés agudo y los receptores NMDA podría explicar la neuroprotección conferida por la ausencia de Tau a las neuronas inmaduras, ya que se ha descrito en numerosos estudios que la presencia de Tau en las dendritas está íntimamente ligada a la cascada de excitotoxicidad glutamatérgica (Rapoport *et al.*, 2002; Roberson *et al.*, 2007; Ittner *et al.*, 2010; Roberson *et al.*, 2011).

El primer trabajo que situó a la proteína Tau en un lugar relevante dentro de esta cascada de excitotoxicidad fue el de Rapoport y colaboradores en el año 2002 (Rapoport *et al.*, 2002), en el que se demostraba *in vitro* que el tratamiento con β -amiloide no producía toxicidad en neuronas deficientes en Tau. Más adelante, esta neuroprotección mediada por la ausencia de Tau fue demostrada también en dos estudios independientes *in vivo* en los que utilizaron diferentes modelos animales tanto para la inducción de la toxicidad β -amiloide como para la deficiencia en Tau (Roberson *et al.*, 2007; Ittner *et al.*, 2010). El mecanismo propuesto para explicar la relevancia de Tau en estos procesos se basa principalmente en su interacción con Fyn y su relación con la estabilización del complejo PSD95/NMDAR en las sinapsis. Una interacción estable entre los receptores NMDA y PSD95 parece ser necesaria para el desencadenamiento de la cascada de excitotoxicidad glutamatérgica, lo cual explicaría por qué en ausencia de Tau estos efectos no se producen (Ittner *et al.*, 2010). La relación entre los efectos del β -amiloide, Fyn y Tau se comprobó otra vez posteriormente en un estudio de Roberson y colaboradores en el que se demostró que la ausencia de Tau no sólo reduce la muerte neuronal, sino que además previene la hiperexcitabilidad y las alteraciones cognitivas causadas por los efectos combinados del β -amiloide y un exceso de Fyn (Roberson *et al.*, 2011).

Por otra parte, es interesante recordar que las neuronas granulares inmaduras, además de receptores NMDA, expresan grandes cantidades de receptores AMPA (Garcia *et al.*, 2004; Ambrogini *et al.*, 2006; Llorens-Martin y Trejo, 2011) que también pueden ser activados por glucocorticoides (Manji *et al.*, 2003). La activación de receptores AMPA, al contrario de lo que ocurre con los NMDA, está asociada a incrementos en la neurogénesis hipocampal adulta (Bai *et al.*, 2003). En este sentido, es importante mencionar que en los ratones WT sometidos al test de Porsolt se produjo una disminución en los niveles de receptores AMPA en el hipocampo. Esta disminución, sin embargo, no tuvo lugar en los ratones Tau^{-/-}, lo cual puede haber contribuido también a los efectos neuroprotectores de la ausencia de Tau. De hecho, efectos neuroprotectores ligados a un aumento en la expresión de receptores AMPA se han descrito previamente en este mismo modelo de inducción de estrés (Llorens-Martin y Trejo, 2011). Además, se ha descrito que

la ausencia de Tau impide la internalización de estos receptores (Regan *et al.*, 2015), con lo cual es posible que además de no ser degradados sigan siendo funcionales.

En resumen, parece que la ausencia de Tau protege parcialmente a las nuevas neuronas que se encuentran en proceso de maduración de la muerte provocada por el estrés agudo. Además, una vez han madurado continúa ejerciendo efectos neuroprotectores frente a los efectos negativos del estrés sobre su morfología dendrítica y sus conexiones sinápticas.

4. Implicación de la proteína Tau en la modulación de la neurogénesis hipocampal adulta: una visión general

A vista de los resultados obtenidos en esta tesis, podría afirmarse que la proteína Tau está implicada tanto en la maduración e integración sináptica de las nuevas neuronas generadas en el hipocampo adulto, como en la modulación del proceso ante estímulos externos.

En condiciones basales la ausencia de Tau retrasa la maduración de las nuevas neuronas granulares, pero no tiene consecuencias sobre la tasa de neurogénesis hipocampal adulta. Sin embargo, la ausencia de Tau atenúa tanto los efectos positivos del EA como los efectos negativos del estrés agudo sobre este proceso. Así pues, parece que la presencia de Tau resulta especialmente necesaria en la adaptación de la neurogénesis hipocampal adulta ante cambios del ambiente.

La eliminación de las formas patológicas de la proteína Tau para combatir diversas enfermedades neurodegenerativas es una de las estrategias terapéuticas que ha acaparado más atención en los últimos años. No obstante, es importante tener en cuenta, a la hora de desarrollar nuevas terapias, las posibles consecuencias que la ausencia de Tau podría tener a distintos niveles funcionales, abarcando desde la disminución de la capacidad de adaptación del proceso de neurogénesis hipocampal adulta a estímulos externos, hasta la pérdida generalizada de plasticidad cerebral y la consiguiente alteración de las funciones cognitivas superiores.

CONCLUSIONES

1. La ausencia de proteína Tau no produce alteraciones en la tasa de neurogénesis hipocampal adulta en condiciones basales. Esto es, no produce alteraciones en las tasas de proliferación, muerte ni supervivencia celular de las nuevas neuronas granulares generadas en el giro dentado (DG). Tampoco produce alteraciones en la expresión de marcadores característicos de los distintos estadios de diferenciación.
2. La ausencia de proteína Tau produce un retraso en la maduración morfológica del árbol dendrítico y alteraciones en las densidades postsinápticas (PSDs) de las nuevas neuronas granulares generadas en el DG en condiciones basales, pero no afecta a la morfología de los terminales axónicos que se forman en CA3.
3. Las alteraciones ocasionadas por la ausencia de proteína Tau en la maduración de las nuevas neuronas granulares generadas en el DG en condiciones basales no se ven reflejadas en diferencias comportamentales de tipo cognitivo en el *"Novel Object Location Preference Test"*. Tampoco aparecen alteraciones en el comportamiento de tipo depresión en el test de Porsolt, pero sí se aprecia un aumento del comportamiento de tipo ansiedad en el *"Elevated Plus Maze Test"*.
4. La ausencia de proteína Tau atenúa los efectos estimuladores del enriquecimiento ambiental (EA) sobre la supervivencia de las nuevas neuronas granulares generadas en el DG adulto.
5. La ausencia de proteína Tau impide los efectos estimuladores del EA sobre la dendritogénesis de las nuevas neuronas granulares generadas en el DG adulto. Además, altera las modificaciones en los contactos sinápticos tanto aferentes como eferentes que tienen lugar en respuesta a la mayor demanda de procesamiento de información que supone el EA en los animales WT.
6. La ausencia de proteína Tau confiere una neuroprotección parcial a las nuevas neuronas granulares del DG adulto que se encuentran en proceso de maduración frente a la muerte provocada por el estrés agudo derivado del test de Porsolt.
7. La ausencia de proteína Tau ejerce efectos neuroprotectores frente a los efectos negativos del estrés agudo derivado del test de Porsolt sobre la morfología dendrítica y las conexiones sinápticas aferentes y eferentes de las nuevas neuronas generadas en el DG adulto una vez han completado su proceso de maduración.

BIBLIOGRAFÍA

- Aberg, M. A., Aberg, N. D., Hedbacker, H., Oscarsson, J., Eriksson, P. S. (2000). Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20, 2896-903.
- Aberg, M. A., Aberg, N. D., Palmer, T. D., Alborn, A. M., Carlsson-Skewir, C., Bang, P., Rosengren, L. E., Olsson, T., Gage, F. H., Eriksson, P. S. (2003). IGF-I has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol Cell Neurosci* 24, 23-40.
- Abrous, D. N., Adriani, W., Montaron, M. F., Aurousseau, C., Rougon, G., Le Moal, M., Piazza, P. V. (2002). Nicotine self-administration impairs hippocampal plasticity. *J Neurosci* 22, 3656-62.
- Ahmed, T., Van der Jeugd, A., Blum, D., Galas, M. C., D'Hooze, R., Buee, L., Balschun, D. (2014). Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. *Neurobiol Aging* 35, 2474-8.
- Aimone, J. B., Wiles, J., Gage, F. H. (2006). Potential role for adult neurogenesis in the encoding of time in new memories. *Nat Neurosci* 9, 723-7.
- Aimone, J. B., Deng, W., Gage, F. H. (2011). Resolving new memories: a critical look at the dentate gyrus, adult neurogenesis, and pattern separation. *Neuron* 70, 589-96.
- Aizawa, H., Kawasaki, H., Murofushi, H., Kotani, S., Suzuki, K., Sakai, H. (1989). A common amino acid sequence in 190-kDa microtubule-associated protein and tau for the promotion of microtubule assembly. *J Biol Chem* 264, 5885-90.
- Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* 135, 1127-8.
- Altman, J., Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-35.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiat* 64, 146-48.
- Ambrogini, P., Cuppini, R., Ferri, P., Mancini, C., Ciaroni, S., Voci, A., Gerdoni, E., Gallo, G. (2005). Thyroid hormones affect neurogenesis in the dentate gyrus of adult rat. *Neuroendocrinology* 81, 244-53.
- Ambrogini, P., Minelli, A., Lattanzi, D., Ciuffoli, S., Fanelli, M., Cuppini, R. (2006). Synaptically-silent immature neurons show GABA and glutamate receptor-mediated currents in adult rat dentate gyrus. *Arch Ital Biol* 144, 115-26.
- Amos, L. A. (2004). Microtubule structure and its stabilisation. *Org Biomol Chem* 2, 2153-60.
- Andreadis, A., Brown, W. M., Kosik, K. S. (1992). Structure and novel exons of the human tau gene. *Biochemistry* 31, 10626-33.
- Andreadis, A., Broderick, J. A., Kosik, K. S. (1995). Relative exon affinities and suboptimal splice site signals lead to non-equivalence of two cassette exons. *Nucleic Acids Res* 23, 3585-93.
- Arendt, T. (2003). Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Prog Neurobiol* 71, 83-248.
- Arisi, G. M., Foresti, M. L., Mukherjee, S., Shapiro, L. A. (2012). The role of olfactory stimulus in adult mammalian neurogenesis. *Behav Brain Res* 227, 356-62.
- Aronov, S., Aranda, G., Behar, L., Ginzburg, I. (2001). Axonal tau mRNA localization coincides with tau protein in living neuronal cells and depends on axonal targeting signal. *J Neurosci* 21, 6577-87.
- Arrasate, M., Perez, M., Valpuesta, J. M., Avila, J. (1997). Role of glycosaminoglycans in determining the helicity of paired helical filaments. *Am J Pathol* 151, 1115-22.
- Arrasate, M., Perez, M., Avila, J. (2000). Tau dephosphorylation at tau-1 site correlates with its association to cell membrane. *Neurochem Res* 25, 43-50.

- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8, 963-70.
- Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M., Hernandez, F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* 84, 361-84.
- Bai, F., Bergeron, M., Nelson, D. L. (2003). Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology* 44, 1013-21.
- Blakeslee, S. (2000). A decade of discovery yields a shock about the brain. *New York Times*, January 4 p 1.
- Ballatore, C., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8, 663-72.
- Ben-Hur, T., Rogister, B., Murray, K., Rougon, G., Dubois-Dalcq, M. (1998). Growth and fate of PSA-NCAM+ precursors of the postnatal brain. *J Neurosci* 18, 5777-88.
- Benaroya-Milshtein, N., Hollander, N., Apter, A., Kukulansky, T., Raz, N., Wilf, A., Yaniv, I., Pick, C. G. (2004). Environmental enrichment in mice decreases anxiety, attenuates stress responses and enhances natural killer cell activity. *Eur J Neurosci* 20, 1341-7.
- Bengzon, J., Kokaia, Z., Elmer, E., Nanobashvili, A., Kokaia, M., Lindvall, O. (1997). Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10432-7.
- Brady, R. M., Zinkowski, R. P., Binder, L. I. (1995). Presence of tau in isolated nuclei from human brain. *Neurobiol Aging* 16, 479-86.
- Brandt, M. D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., von der Behrens, W., Kempermann, G. (2003). Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24, 603-13.
- Brandt, R., Leger, J., Lee, G. (1995). Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain. *J Cell Biol* 131, 1327-40.
- Brezun, J. M., Daszuta, A. (1999). Depletion in serotonin decreases neurogenesis in the dentate gyrus and the subventricular zone of adult rats. *Neuroscience* 89, 999-1002.
- Brion, J. P., Smith, C., Couck, A. M., Gallo, J. M., Anderton, B. H. (1993). Developmental changes in tau phosphorylation: fetal tau is transiently phosphorylated in a manner similar to paired helical filament-tau characteristic of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 61, 2071-80.
- Brion, J. P., Octave, J. N., Couck, A. M. (1994). Distribution of the phosphorylated microtubule-associated protein tau in developing cortical neurons. *Neuroscience* 63, 895-909.
- Brown, J., Cooper-Kuhn, C. M., Kempermann, G., Van Praag, H., Winkler, J., Gage, F. H., Kuhn, H. G. (2003). Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 17, 2042-6.
- Bruel-Jungerman, E., Laroche, S., Rampon, C. (2005). New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur J Neurosci* 21, 513-21.
- Bullmann, T., de Silva, R., Holzer, M., Mori, H., Arendt, T. (2007). Expression of embryonic tau protein isoforms persist during adult neurogenesis in the hippocampus. *Hippocampus* 17, 98-102.
- Byrd, C. A., Brunjes, P. C. (2001). Neurogenesis in the olfactory bulb of adult zebrafish. *Neuroscience* 105, 793-801.
- Caceres, A., Kosik, K. S. (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature* 343, 461-3.

- Cameron, H. A., Woolley, C. S., Gould, E. (1993a). Adrenal steroid receptor immunoreactivity in cells born in the adult rat dentate gyrus. *Brain Res* 611, 342-6.
- Cameron, H. A., Woolley, C. S., McEwen, B. S., Gould, E. (1993b). Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56, 337-44.
- Cameron, H. A., McEwen, B. S., Gould, E. (1995). Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 15, 4687-92.
- Cameron, H. A., Tanapat, P., Gould, E. (1998). Adrenal steroids and N-methyl-D-aspartate receptor activation regulate neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats through a common pathway. *Neuroscience* 82, 349-54.
- Cameron, H. A. y McKay, R. D. (1999). Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci* 2, 894-7.
- Cao, F., Hata, R., Zhu, P., Ma, Y. J., Tanaka, J., Hanakawa, Y., Hashimoto, K., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Sakanaka, M. (2006). Overexpression of SOCS3 inhibits astroglialogenesis and promotes maintenance of neural stem cells. *J Neurochem* 98, 459-70.
- Carlen, M., Cassidy, R. M., Brismar, H., Smith, G. A., Enquist, L. W., Frisen, J. (2002). Functional integration of adult-born neurons. *Curr Biol* 12, 606-8.
- Cayre, M., Malaterre, J., Charpin, P., Strambi, C., Strambi, A. (2000). Fate of neuroblast progeny during postembryonic development of mushroom bodies in the house cricket, *Acheta domesticus*. *J Insect Physiol* 46, 313-319.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y., Kirschner, M. W. (1977a). Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J Mol Biol* 116, 227-47.
- Cleveland, D. W., Hwo, S. Y., Kirschner, M. W. (1977b). Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J Mol Biol* 116, 207-25.
- Condeelis, C. y Caceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10, 319-32.
- Cooper-Kuhn, C. M., Winkler, J., Kuhn, H. G. (2004). Decreased neurogenesis after cholinergic forebrain lesion in the adult rat. *J Neurosci Res* 77, 155-65.
- Couchie, D., Mavilia, C., Georgieff, I. S., Liem, R. K., Shelanski, M. L., Nunez, J. (1992). Primary structure of high molecular weight tau present in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4378-81.
- Couillard-Despres, S., Winner, B., Karl, C., Lindemann, G., Schmid, P., Aigner, R., Laemke, J., Bogdahn, U., Winkler, J., Bischofberger, J., Aigner, L. (2006). Targeted transgene expression in neuronal precursors: watching young neurons in the old brain. *Eur J Neurosci* 24, 1535-45.
- Cross, D. C., Munoz, J. P., Hernandez, P., Maccioni, R. B. (2000). Nuclear and cytoplasmic tau proteins from human nonneuronal cells share common structural and functional features with brain tau. *J Cell Biochem* 78, 305-17.
- Cummings, J. L. (2004). Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 351, 56-67.
- Czeh, B. y Lucassen, P. J. (2007). What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257, 250-60.
- Chancey, J. H., Adlaf, E. W., Sapp, M. C., Pugh, P. C., Wadiche, J. I., Overstreet-Wadiche, L. S. (2013). GABA depolarization is required for experience-dependent synapse unsilencing in adult-born neurons. *J Neurosci* 33, 6614-22.
- Cheng, A., Wang, S., Cai, J., Rao, M. S., Mattson, M. P. (2003). Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev Biol* 258, 319-33.

- Dartigues, J. F. (2009). Alzheimer's disease: a global challenge for the 21st century. *Lancet Neurol* 8, 1082-3.
- David, D. J., Samuels, B. A., Rainer, Q., Wang, J. W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D. A., Guiard, B. P., Guilloux, J. P., Artymyshyn, R. P., Gardier, A. M., Gerald, C., Antonijevic, I. A., Leonardo, E. D. Hen, R. (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62, 479-93.
- David, D. J., Wang, J., Samuels, B. A., Rainer, Q., David, I., Gardier, A. M. Hen, R. (2010). Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders. *Neuroscientist* 16, 578-91.
- Dawson, H. N., Ferreira, A., Eyster, M. V., Ghoshal, N., Binder, L. I. Vitek, M. P. (2001). Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* 114, 1179-87.
- Decker, J. M., Kruger, L., Sydow, A., Zhao, S., Frotscher, M., Mandelkow, E. Mandelkow, E. M. (2015). Pro-aggregant Tau impairs mossy fiber plasticity due to structural changes and Ca⁺⁺ dysregulation. *Acta Neuropathol Commun* 3, 23.
- Deng, W., Aimone, J. B. Gage, F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 11, 339-50.
- Deshpande, A., Bergami, M., Ghanem, A., Conzelmann, K. K., Lepier, A., Gotz, M. Berninger, B. (2013). Retrograde monosynaptic tracing reveals the temporal evolution of inputs onto new neurons in the adult dentate gyrus and olfactory bulb. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E1152-61.
- Desouza, L. A., Ladiwala, U., Daniel, S. M., Agashe, S., Vaidya, R. A. Vaidya, V. A. (2005). Thyroid hormone regulates hippocampal neurogenesis in the adult rat brain. *Mol Cell Neurosci* 29, 414-26.
- Detke, M. J., Rickels, M. Lucki, I. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* 121, 66-72.
- Dixit, R., Ross, J. L., Goldman, Y. E. Holzbaur, E. L. (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 319, 1086-9.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J. M. Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci* 17, 5046-61.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M. Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-16.
- Dominguez, M. I., Blasco-Ibanez, J. M., Crespo, C., Marques-Mari, A. I. Martinez-Guijarro, F. J. (2003). Calretinin/PSA-NCAM immunoreactive granule cells after hippocampal damage produced by kainic acid and DEDTC treatment in mouse. *Brain Res* 966, 206-17.
- Drechsel, D. N., Hyman, A. A., Cobb, M. H. Kirschner, M. W. (1992). Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Mol Biol Cell* 3, 1141-54.
- Dupret, D., Revest, J. M., Koehl, M., Ichas, F., De Giorgi, F., Costet, P., Abrous, D. N. Piazza, P. V. (2008). Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS One* 3, e1959.
- Duyckaerts, C., Potier, M. C. Delatour, B. (2008). Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115, 5-38.
- Ebneth, A., Godemann, R., Stamer, K., Illenberger, S., Trinczek, B. Mandelkow, E. (1998). Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 143, 777-94.

- Eisch, A. J., Barrot, M., Schad, C. A., Self, D. W., Nestler, E. J. (2000). Opiates inhibit neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7579-84.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., Gage, F. H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-7.
- Esposito, M. S., Piatti, V. C., Laplagne, D. A., Morgenstern, N. A., Ferrari, C. C., Pitossi, F. J., Schinder, A. F. (2005). Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci* 25, 10074-86.
- Faulkner, R. L., Jang, M. H., Liu, X. B., Duan, X., Sailor, K. A., Kim, J. Y., Ge, S., Jones, E. G., Ming, G. L., Song, H., Cheng, H. J. (2008). Development of hippocampal mossy fiber synaptic outputs by new neurons in the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14157-62.
- Fellous, A., Francon, J., Lennon, A. M., Nunez, J. (1977). Microtubule assembly in vitro. Purification of assembly-promoting factors. *Eur J Biochem* 78, 167-74.
- Feng, L., Hatten, M. E., Heintz, N. (1994). Brain lipid-binding protein (BLBP): a novel signaling system in the developing mammalian CNS. *Neuron* 12, 895-908.
- Ferri, A. L., Cavallaro, M., Braida, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P. P., Sala, M., De Biasi, S., Nicolis, S. K. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131, 3805-19.
- Filippov, V., Kronenberg, G., Pivneva, T., Reuter, K., Steiner, B., Wang, L. P., Yamaguchi, M., Kettenmann, H., Kempermann, G. (2003). Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci* 23, 373-82.
- Foster, T. C. y Dumas, T. C. (2001). Mechanism for increased hippocampal synaptic strength following differential experience. *J Neurophysiol* 85, 1377-83.
- Fujio, K., Sato, M., Uemura, T., Sato, T., Sato-Harada, R., Harada, A. (2007). 14-3-3 proteins and protein phosphatases are not reduced in tau-deficient mice. *Neuroreport* 18, 1049-52.
- Fuster-Matanzo, A., de Barreda, E. G., Dawson, H. N., Vitek, M. P., Avila, J., Hernandez, F. (2009). Function of tau protein in adult newborn neurons. *FEBS Lett* 583, 3063-8.
- Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martin, M., Hernandez, F., Avila, J. (2013). Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. *Mediators Inflamm* 2013, 260925.
- Galani, R., Berthel, M. C., Lazarus, C., Majchrzak, M., Barbelivien, A., Kelche, C., Cassel, J. C. (2007). The behavioral effects of enriched housing are not altered by serotonin depletion but enrichment alters hippocampal neurochemistry. *Neurobiol Learn Mem* 88, 1-10.
- Garcia, A., Steiner, B., Kronenberg, G., Bick-Sander, A., Kempermann, G. (2004). Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. *Aging Cell* 3, 363-71.
- Garcia-Segura, L. M. y Wise, P. M. (2000). Introduction to the special issue on neuroprotection by steroids: new perspectives. *J Neurocytol* 29, 305-6.
- Garcia-Segura, L. M. (2008). Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J Neuroendocrinol* 20, 705-12.
- Ge, S., Goh, E. L., Sailor, K. A., Kitabatake, Y., Ming, G. L., Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589-93.
- Ge, S., Sailor, K. A., Ming, G. L., Song, H. (2008). Synaptic integration and plasticity of new neurons in the adult hippocampus. *J Physiol* 586, 3759-65.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R. A. (1989a). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519-26.

- Goedert, M., Spillantini, M. G., Potier, M. C., Ulrich, J., Crowther, R. A. (1989b). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J* 8, 393-9.
- Goedert, M., Jakes, R., Qi, Z., Wang, J. H., Cohen, P. (1995). Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Neurochem* 65, 2804-7.
- Goedert, M. y Spillantini, M. G. (2001). Tau gene mutations and neurodegeneration. *Biochem Soc Symp*, 59-71.
- Goldman, S. A. y Nottebohm, F. (1983). Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2390-4.
- Gomez-Nicola, D., Suzzi, S., Vargas-Caballero, M., Fransen, N. L., Al-Malki, H., Cebrian-Silla, A., Garcia-Verdugo, J. M., Riecken, K., Fehse, B., Perry, V. H. (2014). Temporal dynamics of hippocampal neurogenesis in chronic neurodegeneration. *Brain* 137, 2312-28.
- Gomez de Barreda, E. (2010). Estudio de las funciones fisiológicas y patológicas de la proteína Tau mediante el uso de modelos murinos deficientes en Tau. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
- Gomez de Barreda, E., Perez, M., Gomez Ramos, P., de Cristobal, J., Martin-Maestro, P., Moran, A., Dawson, H. N., Vitek, M. P., Lucas, J. J., Hernandez, F., Avila, J. (2010). Tau-knockout mice show reduced GSK3-induced hippocampal degeneration and learning deficits. *Neurobiol Dis* 37, 622-9.
- Goode, B. L. y Feinstein, S. C. (1994). Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J Cell Biol* 124, 769-82.
- Gotz, J. y Ittner, L. M. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 9, 532-44.
- Gould, E., Cameron, H. A., Daniels, D. C., Woolley, C. S., McEwen, B. S. (1992). Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci* 12, 3642-50.
- Gould, E., Cameron, H. A., McEwen, B. S. (1994). Blockade of NMDA receptors increases cell death and birth in the developing rat dentate gyrus. *J Comp Neurol* 340, 551-65.
- Gould, E., McEwen, B. S., Tanapat, P., Galea, L. A., Fuchs, E. (1997). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 17, 2492-8.
- Gould, E., Vail, N., Wagers, M., Gross, C. G. (2001). Adult-generated hippocampal and neocortical neurons in macaques have a transient existence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10910-7.
- Gould, E. (2007). How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci* 8, 481-8.
- Greenwood, J. A. y Johnson, G. V. (1995). Localization and in situ phosphorylation state of nuclear tau. *Exp Cell Res* 220, 332-7.
- Gu, J. y Zheng, J. Q. (2009). Microtubules in Dendritic Spine Development and Plasticity. *Open Neurosci J* 3, 128-133.
- Gubbay, J., Collignon, J., Koopman, P., Capel, B., Economou, A., Munsterberg, A., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R. (1990). A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346, 245-50.
- Haik, S., Gauthier, L. R., Granotier, C., Peyrin, J. M., Lages, C. S., Dormont, D., Boussin, F. D. (2000). Fibroblast growth factor 2 up regulates telomerase activity in neural precursor cells. *Oncogene* 19, 2957-66.

- Hanger, D. P., Anderton, B. H., Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* 15, 112-9.
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., Hirokawa, N. (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature* 369, 488-91.
- Hastings, N. B. y Gould, E. (1999). Rapid extension of axons into the CA3 region by adult-generated granule cells. *J Comp Neurol* 413, 146-54.
- Hattori, S., Hashimoto, R., Miyakawa, T., Yamanaka, H., Maeno, H., Wada, K., Kunugi, H. (2007). Enriched environments influence depression-related behavior in adult mice and the survival of newborn cells in their hippocampi. *Behav Brain Res* 180, 69-76.
- Haug, H. (1986). History of neuromorphometry. *J Neurosci Methods* 18, 1-17.
- Hernandez, F. y Avila, J. (2007). Tauopathies. *Cell Mol Life Sci* 64, 2219-33.
- Hernandez, F. y Avila, J. (2010). Intra- and extracellular protein interactions with tau. *Curr Alzheimer Res* 7, 670-6.
- Hirokawa, N., Shiomura, Y., Okabe, S. (1988). Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *J Cell Biol* 107, 1449-59.
- Hirokawa, N., Funakoshi, T., Sato-Harada, R., Kanai, Y. (1996). Selective stabilization of tau in axons and microtubule-associated protein 2C in cell bodies and dendrites contributes to polarized localization of cytoskeletal proteins in mature neurons. *J Cell Biol* 132, 667-79.
- Hitti, F. L. y Siegelbaum, S. A. (2014). The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature* 508, 88-92.
- Ho, N. F., Hooker, J. M., Sahay, A., Holt, D. J., Roffman, J. L. (2013). In vivo imaging of adult human hippocampal neurogenesis: progress, pitfalls and promise. *Mol Psychiatry* 18, 404-16.
- Hoglinger, G. U., Rizk, P., Muriel, M. P., Duyckaerts, C., Oertel, W. H., Caille, I., Hirsch, E. C. (2004). Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7, 726-35.
- Holth, J. K., Bomben, V. C., Reed, J. G., Inoue, T., Younkin, L., Younkin, S. G., Pautler, R. G., Botas, J., Noebels, J. L. (2013). Tau loss attenuates neuronal network hyperexcitability in mouse and Drosophila genetic models of epilepsy. *J Neurosci* 33, 1651-9.
- Hong, X. P., Peng, C. X., Wei, W., Tian, Q., Liu, Y. H., Yao, X. Q., Zhang, Y., Cao, F. Y., Wang, Q., Wang, J. Z. (2010). Essential role of tau phosphorylation in adult hippocampal neurogenesis. *Hippocampus* 20, 1339-49.
- Hu, Y. S., Xu, P., Pigino, G., Brady, S. T., Larson, J., Lazarov, O. (2010). Complex environment experience rescues impaired neurogenesis, enhances synaptic plasticity, and attenuates neuropathology in familial Alzheimer's disease-linked APP^{swe}/PS1^{DeltaE9} mice. *FASEB J* 24, 1667-81.
- Hu, Y. S., Long, N., Pigino, G., Brady, S. T., Lazarov, O. (2013). Molecular mechanisms of environmental enrichment: impairments in Akt/GSK3 β , neurotrophin-3 and CREB signaling. *PLoS One* 8, e64460.
- Hutchinson, E., Avery, A., Vandewoude, S. (2005). Environmental enrichment for laboratory rodents. *ILAR J* 46, 148-61.
- Huttmann, K., Sadgrove, M., Wallraff, A., Hinterkeuser, S., Kirchhoff, F., Steinhauser, C., Gray, W. P. (2003). Seizures preferentially stimulate proliferation of radial glia-like astrocytes in the adult dentate gyrus: functional and immunocytochemical analysis. *Eur J Neurosci* 18, 2769-78.
- Ingelson, M., Vanmechelen, E., Lannfelt, L. (1996). Microtubule-associated protein tau in human fibroblasts with the Swedish Alzheimer mutation. *Neurosci Lett* 220, 9-12.

- Ittner, L. M., Ke, Y. D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wolfing, H., Chieng, B. C., Christie, M. J., Napier, I. A., Eckert, A., Staufenbiel, M., Hardeman, E., Gotz, J. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 142, 387-97.
- Ittner, L. M. y Gotz, J. (2011). Amyloid-beta and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12, 65-72.
- Jagasia, R., Steib, K., Englberger, E., Herold, S., Faus-Kessler, T., Saxe, M., Gage, F. H., Song, H., Lie, D. C. (2009). GABA-cAMP response element-binding protein signaling regulates maturation and survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 29, 7966-77.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L., Greenberg, D. A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11946-50.
- Jin, K., Peel, A. L., Mao, X. O., Xie, L., Cottrell, B. A., Henshall, D. C., Greenberg, D. A. (2004). Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 343-7.
- Kaplan, M. S. y Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197, 1092-4.
- Kar, S., Fan, J., Smith, M. J., Goedert, M., Amos, L. A. (2003). Repeat motifs of tau bind to the insides of microtubules in the absence of taxol. *EMBO J* 22, 70-7.
- Ke, Y. D., Suchowerska, A. K., van der Hoven, J., De Silva, D. M., Wu, C. W., van Eersel, J., Ittner, A., Ittner, L. M. (2012). Lessons from tau-deficient mice. *Int J Alzheimers Dis* 2012, 873270.
- Kelsch, W., Lin, C. W., Lois, C. (2008). Sequential development of synapses in dendritic domains during adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16803-8.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., Gage, F. H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-5.
- Kempermann, G., Kuhn, H. G., Gage, F. H. (1998). Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci* 18, 3206-12.
- Kempermann, G. (2002). Why new neurons? Possible functions for adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 22, 635-8.
- Kempermann, G., Gast, D., Kronenberg, G., Yamaguchi, M., Gage, F. H. (2003). Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 130, 391-9.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G. (2004). Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27, 447-52.
- Kempermann, G. (2006). Adult neurogenesis: stem cells and neuronal development in the adult brain. New York: Oxford University Press.
- Kharatishvili, I., Nissinen, J. P., McIntosh, T. K., Pitkanen, A. (2006). A model of posttraumatic epilepsy induced by lateral fluid-percussion brain injury in rats. *Neuroscience* 140, 685-97.
- Kimura, T., Whitcomb, D. J., Jo, J., Regan, P., Piers, T., Heo, S., Brown, C., Hashikawa, T., Murayama, M., Seok, H., Sotiropoulos, I., Kim, E., Collingridge, G. L., Takashima, A., Cho, K. (2014). Microtubule-associated protein tau is essential for long-term depression in the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369, 20130144.
- Kirschenbaum, B., Nedergaard, M., Preuss, A., Barami, K., Fraser, R. A., Goldman, S. A. (1994). In vitro neuronal production and differentiation by precursor cells derived from the adult human forebrain. *Cereb Cortex* 4, 576-89.
- Kirschner, M. y Mitchison, T. (1986). Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* 45, 329-42.
- Kitamura, T. y Inokuchi, K. (2014). Role of adult neurogenesis in hippocampal-cortical memory consolidation. *Mol Brain* 7, 13.

- Kohara, K., Pignatelli, M., Rivest, A. J., Jung, H. Y., Kitamura, T., Suh, J., Frank, D., Kajikawa, K., Mise, N., Obata, Y., Wickersham, I. R. Tonegawa, S. (2014). Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nat Neurosci* 17, 269-79.
- Komuro, Y., Xu, G., Bhaskar, K. Lamb, B. T. (2015). Human tau expression reduces adult neurogenesis in a mouse model of tauopathy. *Neurobiol Aging* 36, 2034-42.
- Kosik, K. S., Orecchio, L. D., Bakalis, S. Neve, R. L. (1989). Developmentally regulated expression of specific tau sequences. *Neuron* 2, 1389-97.
- Kron, M. M., Zhang, H. Parent, J. M. (2010). The developmental stage of dentate granule cells dictates their contribution to seizure-induced plasticity. *J Neurosci* 30, 2051-9.
- Kronenberg, G., Reuter, K., Steiner, B., Brandt, M. D., Jessberger, S., Yamaguchi, M. Kempermann, G. (2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J Comp Neurol* 467, 455-63.
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H. Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16, 2027-33.
- Kuhn, H. G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L. J. Gage, F. H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci* 17, 5820-9.
- Kukekov, V. G., Laywell, E. D., Suslov, O., Davies, K., Scheffler, B., Thomas, L. B., O'Brien, T. F., Kusakabe, M. Steindler, D. A. (1999). Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol* 156, 333-44.
- Kulkarni, V. A., Jha, S. Vaidya, V. A. (2002). Depletion of norepinephrine decreases the proliferation, but does not influence the survival and differentiation, of granule cell progenitors in the adult rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 16, 2008-12.
- Lee, G., Newman, S. T., Gard, D. L., Band, H. Panchamoorthy, G. (1998). Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases. *J Cell Sci* 111 (Pt 21), 3167-77.
- Lee, H., Lee, D., Park, C. H., Ho, W. K. Lee, S. H. (2012). GABA mediates the network activity-dependent facilitation of axonal outgrowth from the newborn granule cells in the early postnatal rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 36, 2743-52.
- Lee, J., Duan, W. Mattson, M. P. (2002). Evidence that brain-derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *J Neurochem* 82, 1367-75.
- Lee, V. M., Goedert, M. Trojanowski, J. Q. (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci* 24, 1121-59.
- Leger, M., Paizanis, E., Dzahini, K., Quiedeville, A., Bouet, V., Cassel, J. C., Freret, T., Schumann-Bard, P. Boulouard, M. (2014). Environmental Enrichment Duration Differentially Affects Behavior and Neuroplasticity in Adult Mice. *Cereb Cortex*.
- Lei, P., Ayton, S., Finkelstein, D. I., Spoerri, L., Ciccotosto, G. D., Wright, D. K., Wong, B. X., Adlard, P. A., Cherny, R. A., Lam, L. Q., Roberts, B. R., Volitakis, I., Egan, G. F., McLean, C. A., Cappai, R., Duce, J. A. Bush, A. I. (2012). Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. *Nat Med* 18, 291-5.
- Lei, P., Ayton, S., Moon, S., Zhang, Q., Volitakis, I., Finkelstein, D. I. Bush, A. I. (2014). Motor and cognitive deficits in aged tau knockout mice in two background strains. *Mol Neurodegener* 9, 29.
- Lepousez, G., Nissant, A. Lledo, P. M. (2015). Adult Neurogenesis and the Future of the Rejuvenating Brain Circuits. *Neuron* 86, 387-401.
- Leuner, B., Glasper, E. R. Gould, E. (2009). Thymidine analog methods for studies of adult neurogenesis are not equally sensitive. *J Comp Neurol* 517, 123-33.

- Leverenz, J. B., Wilkinson, C. W., Wamble, M., Corbin, S., Grabber, J. E., Raskind, M. A., Peskind, E. R. (1999). Effect of chronic high-dose exogenous cortisol on hippocampal neuronal number in aged nonhuman primates. *J Neurosci* 19, 2356-61.
- Lewis, P. F. y Emerman, M. (1994). Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 68, 510-6.
- Lichtenwalner, R. J., Forbes, M. E., Bennett, S. A., Lynch, C. D., Sonntag, W. E., Riddle, D. R. (2001). Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 107, 603-13.
- Liu, J., Solway, K., Messing, R. O., Sharp, F. R. (1998). Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18, 7768-78.
- Liu, L., Wong, T. P., Pozza, M. F., Lingenhoehl, K., Wang, Y., Sheng, M., Auberson, Y. P., Wang, Y. T. (2004). Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304, 1021-4.
- Loomis, P. A., Howard, T. H., Castleberry, R. P., Binder, L. I. (1990). Identification of nuclear tau isoforms in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 8422-6.
- Lopez-Garcia, C., Molowny, A., Garcia-Verdugo, J. M., Ferrer, I. (1988). Delayed postnatal neurogenesis in the cerebral cortex of lizards. *Brain Res* 471, 167-74.
- LoPresti, P., Szuchet, S., Papasozomenos, S. C., Zinkowski, R. P., Binder, L. I. (1995). Functional implications for the microtubule-associated protein tau: localization in oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 10369-73.
- LoTurco, J. (2004). Doublecortin and a tale of two serines. *Neuron* 41, 175-7.
- Lu, M. y Kosik, K. S. (2001). Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Mol Biol Cell* 12, 171-84.
- Llorens-Martin, M., Torres-Aleman, I., Trejo, J. L. (2006). Pronounced individual variation in the response to the stimulatory action of exercise on immature hippocampal neurons. *Hippocampus* 16, 480-90.
- Llorens-Martin, M. V., Rueda, N., Martinez-Cue, C., Torres-Aleman, I., Florez, J., Trejo, J. L. (2007). Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. *Neuroscience* 147, 631-8.
- Llorens-Martin, M., Tejeda, G. S., Trejo, J. L. (2010). Differential regulation of the variations induced by environmental richness in adult neurogenesis as a function of time: a dual birthdating analysis. *PLoS One* 5, e12188.
- Llorens-Martin, M. y Trejo, J. L. (2011). Mifepristone prevents stress-induced apoptosis in newborn neurons and increases AMPA receptor expression in the dentate gyrus of C57/BL6 mice. *PLoS One* 6, e28376.
- Llorens-Martin, M., Hernandez, F., Avila, J. (2011a). Expression of frontotemporal dementia with parkinsonism associated to chromosome 17 tau induces specific degeneration of the ventral dentate gyrus and depressive-like behavior in mice. *Neuroscience* 196, 215-27.
- Llorens-Martin, M., Tejeda, G. S., Trejo, J. L. (2011b). Antidepressant and proneurogenic influence of environmental enrichment in mice: protective effects vs recovery. *Neuropsychopharmacology* 36, 2460-8.
- Llorens-Martin, M., Teixeira, C. M., Fuster-Matanzo, A., Jurado-Arjona, J., Borrell, V., Soriano, E., Avila, J., Hernandez, F. (2012). Tau isoform with three microtubule binding domains is a marker of new axons generated from the subgranular zone in the hippocampal dentate gyrus: implications for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 29, 921-30.
- Llorens-Martin, M., Fuster-Matanzo, A., Teixeira, C. M., Jurado-Arjona, J., Ulloa, F., Defelipe, J., Rabano, A., Hernandez, F., Soriano, E., Avila, J. (2013). GSK-3beta overexpression causes

- reversible alterations on postsynaptic densities and dendritic morphology of hippocampal granule neurons in vivo. *Mol Psychiatry* 18, 451-60.
- Llorens-Martin, M., Jurado-Arjona, J., Avila, J. Hernandez, F. (2015). Novel connection between newborn granule neurons and the hippocampal CA2 field. *Exp Neurol* 263, 285-92.
- Lugert, S., Basak, O., Knuckles, P., Haussler, U., Fabel, K., Gotz, M., Haas, C. A., Kempermann, G., Taylor, V. Giachino, C. (2010). Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6, 445-56.
- Ma, Q. L., Zuo, X., Yang, F., Ubada, O. J., Gant, D. J., Alaverdyan, M., Kiose, N. C., Nazari, S., Chen, P. P., Nothias, F., Chan, P., Teng, E., Frautschy, S. A. Cole, G. M. (2014). Loss of MAP function leads to hippocampal synapse loss and deficits in the Morris Water Maze with aging. *J Neurosci* 34, 7124-36.
- Madsen, T. M., Treschow, A., Bengzon, J., Bolwig, T. G., Lindvall, O. Tingstrom, A. (2000). Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Biol Psychiatry* 47, 1043-9.
- Magavi, S. S., Leavitt, B. R. Macklis, J. D. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405, 951-5.
- Manji, H. K., Quiroz, J. A., Sporn, J., Payne, J. L., Denicoff, K., N, A. G., Zarate, C. A., Jr. Charney, D. S. (2003). Enhancing neuronal plasticity and cellular resilience to develop novel, improved therapeutics for difficult-to-treat depression. *Biol Psychiatry* 53, 707-42.
- Martinez-Cue, C., Baamonde, C., Lumbreras, M., Paz, J., Davisson, M. T., Schmidt, C., Dierssen, M. Florez, J. (2002). Differential effects of environmental enrichment on behavior and learning of male and female Ts65Dn mice, a model for Down syndrome. *Behav Brain Res* 134, 185-200.
- Martinez-Cue, C., Rueda, N., Garcia, E., Davisson, M. T., Schmidt, C. Florez, J. (2005). Behavioral, cognitive and biochemical responses to different environmental conditions in male Ts65Dn mice, a model of Down syndrome. *Behav Brain Res* 163, 174-85.
- McHugh, T. J., Jones, M. W., Quinn, J. J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J. K., Lowell, B. B., Faselow, M. S., Wilson, M. A. Tonegawa, S. (2007). Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* 317, 94-9.
- Medina, M., Avila, J. (2014). New perspectives on the role of tau in Alzheimer's disease. Implications for therapy. *Biochem Pharmacol* 88, 540-7.
- Meshi, D., Drew, M. R., Saxe, M., Ansorge, M. S., David, D., Santarelli, L., Malapani, C., Moore, H. Hen, R. (2006). Hippocampal neurogenesis is not required for behavioral effects of environmental enrichment. *Nat Neurosci* 9, 729-31.
- Meyer, G., Perez-Garcia, C. G. Gleeson, J. G. (2002). Selective expression of doublecortin and LIS1 in developing human cortex suggests unique modes of neuronal movement. *Cereb Cortex* 12, 1225-36.
- Miller, V. y Gomez-Nicola, D. (2014). How can we exploit the brain's ability to repair itself? *Expert Rev Neurother* 14, 1345-8.
- Ming, G. L. y Song, H. (2005). Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28, 223-50.
- Minturn, J. E., Geschwind, D. H., Fryer, H. J. Hockfield, S. (1995). Early postmitotic neurons transiently express TOAD-64, a neural specific protein. *J Comp Neurol* 355, 369-79.
- Mitchison, T. y Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761-72.
- Mitsuya, K., Nitta, N. Suzuki, F. (2009). Persistent zinc depletion in the mossy fiber terminals in the intrahippocampal kainate mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 50, 1979-90.

- Mondragon-Rodriguez, S., Trillaud-Doppia, E., Dudilot, A., Bourgeois, C., Lauzon, M., Leclerc, N.Boehm, J. (2012). Interaction of endogenous tau protein with synaptic proteins is regulated by N-methyl-D-aspartate receptor-dependent tau phosphorylation. *J Biol Chem* 287, 32040-53.
- Montero-Pedrazuela, A., Venero, C., Lavado-Autric, R., Fernandez-Lamo, I., Garcia-Verdugo, J. M., Bernal, J.Guadano-Ferraz, A. (2006). Modulation of adult hippocampal neurogenesis by thyroid hormones: implications in depressive-like behavior. *Mol Psychiatry* 11, 361-71.
- Morris, M., Koyama, A., Masliah, E.Mucke, L. (2011). Tau reduction does not prevent motor deficits in two mouse models of Parkinson's disease. *PLoS One* 6, e29257.
- Mu, Y. y Gage, F. H. (2011). Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 6, 85.
- Mullen, R. J., Buck, C. R.Smith, A. M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-11.
- Mullis, K. B. y Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-50.
- Nacher, J., Rosell, D. R., Alonso-Llosa, G.McEwen, B. S. (2001). NMDA receptor antagonist treatment induces a long-lasting increase in the number of proliferating cells, PSA-NCAM-immunoreactive granule neurons and radial glia in the adult rat dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 13, 512-20.
- Nakashiba, T., Young, J. Z., McHugh, T. J., Buhl, D. L.Tonegawa, S. (2008). Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning. *Science* 319, 1260-4.
- Nakashiba, T., Cushman, J. D., Pelkey, K. A., Renaudineau, S., Buhl, D. L., McHugh, T. J., Rodriguez Barrera, V., Chittajallu, R., Iwamoto, K. S., McBain, C. J., Fanselow, M. S.Tonegawa, S. (2012). Young dentate granule cells mediate pattern separation, whereas old granule cells facilitate pattern completion. *Cell* 149, 188-201.
- Nakazawa, K., Quirk, M. C., Chitwood, R. A., Watanabe, M., Yeckel, M. F., Sun, L. D., Kato, A., Carr, C. A., Johnston, D., Wilson, M. A.Tonegawa, S. (2002). Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in associative memory recall. *Science* 297, 211-8.
- Neve, R. L., Harris, P., Kosik, K. S., Kurnit, D. M.Donlon, T. A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res* 387, 271-80.
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L.Svoboda, K. (2002). Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64, 313-53.
- Nixon, K., Morris, S. A., Liput, D. J.Kelso, M. L. (2010). Roles of neural stem cells and adult neurogenesis in adolescent alcohol use disorders. *Alcohol* 44, 39-56.
- Nunez, J. (1988). Immature and mature variants of MAP2 and tau proteins and neuronal plasticity. *Trends Neurosci* 11, 477-9.
- Ohm, T. G. (2007). The dentate gyrus in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 163, 723-40.
- Okuyama, N., Takagi, N., Kawai, T., Miyake-Takagi, K.Takeo, S. (2004). Phosphorylation of extracellular-regulating kinase in NMDA receptor antagonist-induced newly generated neurons in the adult rat dentate gyrus. *J Neurochem* 88, 717-25.
- Pakkenberg, B. y Gundersen, H. J. (1988). Total number of neurons and glial cells in human brain nuclei estimated by the disector and the fractionator. *J Microsc* 150, 1-20.
- Papazosomenos, S. C. y Su, Y. (1991). Altered phosphorylation of tau protein in heat-shocked rats and patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4543-7.

- Parent, J. M., Yu, T. W., Leibowitz, R. T., Geschwind, D. H., Sloviter, R. S., Lowenstein, D. H. (1997). Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. *J Neurosci* 17, 3727-38.
- Park, I. H., Lerou, P. H., Zhao, R., Huo, H., Daley, G. Q. (2008). Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 3, 1180-6.
- Paton, J. A. y Nottebohm, F. N. (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225, 1046-8.
- Pencea, V., Bingaman, K. D., Wiegand, S. J., Luskin, M. B. (2001). Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci* 21, 6706-17.
- Perez, M., Lim, F., Arrasate, M., Avila, J. (2000). The FTDP-17-linked mutation R406W abolishes the interaction of phosphorylated tau with microtubules. *J Neurochem* 74, 2583-9.
- Pevalova, M., Filipcik, P., Novak, M., Avila, J., Iqbal, K. (2006). Post-translational modifications of tau protein. *Bratisl Lek Listy* 107, 346-53.
- Porsolt, R. D., Bertin, A., Jalfre, M. (1977a). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 229, 327-36.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M., Jalfre, M. (1977b). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-2.
- Pristera, A., Saraulli, D., Farioli-Vecchioli, S., Strimpakos, G., Costanzi, M., di Certo, M. G., Cannas, S., Ciotti, M. T., Tirone, F., Mattei, E., Cestari, V., Canu, N. (2013). Impact of N-tau on adult hippocampal neurogenesis, anxiety, and memory. *Neurobiol Aging* 34, 2551-63.
- Quadrato, G., Elnaggar, M. Y., Duman, C., Sabino, A., Forsberg, K., Di Giovanni, S. (2014). Modulation of GABAA receptor signaling increases neurogenesis and suppresses anxiety through NFATc4. *J Neurosci* 34, 8630-45.
- Rakic, P. y Nowakowski, R. S. (1981). The time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 196, 99-128.
- Rakic, P. (2002). Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. *J Neurosci* 22, 614-618.
- Rangel, L. M., Alexander, A. S., Aimone, J. B., Wiles, J., Gage, F. H., Chiba, A. A., Quinn, L. K. (2014). Temporally selective contextual encoding in the dentate gyrus of the hippocampus. *Nat Commun* 5, 3181.
- Rapoport, M., Dawson, H. N., Binder, L. I., Vitek, M. P., Ferreira, A. (2002). Tau is essential to beta - amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6364-9.
- Regan, P., Piers, T., Yi, J. H., Kim, D. H., Huh, S., Park, S. J., Ryu, J. H., Whitcomb, D. J., Cho, K. (2015). Tau Phosphorylation at Serine 396 Residue Is Required for Hippocampal LTD. *J Neurosci* 35, 4804-12.
- Reif, A., Fritzen, S., Finger, M., Strobel, A., Lauer, M., Schmitt, A., Lesch, K. P. (2006). Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry* 11, 514-22.
- Rendon, A., Jung, D., Jancsik, V. (1990). Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria. *Biochem J* 269, 555-6.
- Reynolds, B. A. y Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-10.
- Roberson, E. D., Scarce-Levie, K., Palop, J. J., Yan, F., Cheng, I. H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G. Q., Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316, 750-4.
- Roberson, E. D., Halabisky, B., Yoo, J. W., Yao, J., Chin, J., Yan, F., Wu, T., Hamto, P., Devidze, N., Yu, G. Q., Palop, J. J., Noebels, J. L., Mucke, L. (2011). Amyloid-beta/Fyn-induced synaptic,

- network, and cognitive impairments depend on tau levels in multiple mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31, 700-11.
- Rodriguez, J. J., Jones, V. C., Tabuchi, M., Allan, S. M., Knight, E. M., LaFerla, F. M., Oddo, S., Verkhatsky, A. (2008). Impaired adult neurogenesis in the dentate gyrus of a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 3, e2935.
- Rosenzweig, M. R. (1966). Environmental complexity, cerebral change, and behavior. *Am Psychol* 21, 321-32.
- Rueda, D., Navarro, B., Martinez-Serrano, A., Guzman, M., Galve-Roperh, I. (2002). The endocannabinoid anandamide inhibits neuronal progenitor cell differentiation through attenuation of the Rap1/B-Raf/ERK pathway. *J Biol Chem* 277, 46645-50.
- Sahay, A. y Hen, R. (2008). Hippocampal neurogenesis and depression. *Novartis Found Symp* 289, 152-60; discussion 160-4, 193-5.
- Sahay, A., Scobie, K. N., Hill, A. S., O'Carroll, C. M., Kheirbek, M. A., Burghardt, N. S., Fenton, A. A., Dranovsky, A., Hen, R. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472, 466-70.
- Sale, A., Berardi, N., Maffei, L. (2009). Enrich the environment to empower the brain. *Trends Neurosci* 32, 233-9.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805-809.
- Sapir, T., Frotscher, M., Levy, T., Mandelkow, E. M., Reiner, O. (2012). Tau's role in the developing brain: implications for intellectual disability. *Hum Mol Genet* 21, 1681-92.
- Saravia, F., Beauquis, J., Pietranera, L., De Nicola, A. F. (2007). Neuroprotective effects of estradiol in hippocampal neurons and glia of middle age mice. *Psychoneuroendocrinology* 32, 480-92.
- Scott, B. W., Wang, S., Burnham, W. M., De Boni, U., Wojtowicz, J. M. (1998). Kindling-induced neurogenesis in the dentate gyrus of the rat. *Neurosci Lett* 248, 73-6.
- Schmidt-Hieber, C., Jonas, P., Bischofberger, J. (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429, 184-7.
- Seki, T. y Arai, Y. (1995). Age-related production of new granule cells in the adult dentate gyrus. *Neuroreport* 6, 2479-82.
- Seki, T. (2002). Expression patterns of immature neuronal markers PSA-NCAM, CRMP-4 and NeuroD in the hippocampus of young adult and aged rodents. *J Neurosci Res* 70, 327-34.
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298, 789-91.
- Seri, B., Garcia-Verdugo, J. M., McEwen, B. S., Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci* 21, 7153-60.
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., Brett, F. M., Farrell, M. A., Rowan, M. J., Lemere, C. A., Regan, C. M., Walsh, D. M., Sabatini, B. L., Selkoe, D. J. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med* 14, 837-42.
- Sheng, M. y Hoogenraad, C. C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* 76, 823-47.
- Shors, T. J., Miesegaes, G., Beylin, A., Zhao, M., Rydel, T., Gould, E. (2001). Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 410, 372-6.
- Snyder, J. S., Radik, R., Wojtowicz, J. M., Cameron, H. A. (2009). Anatomical gradients of adult neurogenesis and activity: young neurons in the ventral dentate gyrus are activated by water maze training. *Hippocampus* 19, 360-70.

- Song, H., Stevens, C. F. Gage, F. H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39-44.
- Song, J., Zhong, C., Bonaguidi, M. A., Sun, G. J., Hsu, D., Gu, Y., Meletis, K., Huang, Z. J., Ge, S., Enikolopov, G., Deisseroth, K., Luscher, B., Christian, K. M., Ming, G. L. Song, H. (2012). Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature* 489, 150-4.
- Song, J., Sun, J., Moss, J., Wen, Z., Sun, G. J., Hsu, D., Zhong, C., Davoudi, H., Christian, K. M., Toni, N., Ming, G. L. Song, H. (2013). Parvalbumin interneurons mediate neuronal circuitry-neurogenesis coupling in the adult hippocampus. *Nat Neurosci* 16, 1728-30.
- Sousa, N. y Almeida, O. F. (2002). Corticosteroids: sculptors of the hippocampal formation. *Rev Neurosci* 13, 59-84.
- Spalding, K. L., Bergmann, O., Alkass, K., Bernard, S., Salehpour, M., Huttner, H. B., Bostrom, E., Westerlund, I., Vial, C., Buchholz, B. A., Possnert, G., Mash, D. C., Druid, H. Frisen, J. (2013). Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 153, 1219-27.
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E. Mandelkow, E. M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *J Cell Biol* 156, 1051-63.
- Suh, J., Rivest, A. J., Nakashiba, T., Tominaga, T. Tonegawa, S. (2011). Entorhinal cortex layer III input to the hippocampus is crucial for temporal association memory. *Science* 334, 1415-20.
- Sundholm-Peters, N. L., Yang, H. K., Goings, G. E., Walker, A. S. Szele, F. G. (2004). Radial glia-like cells at the base of the lateral ventricles in adult mice. *J Neurocytol* 33, 153-64.
- Takagi, Y., Nozaki, K., Takahashi, J., Yodoi, J., Ishikawa, M. Hashimoto, N. (1999). Proliferation of neuronal precursor cells in the dentate gyrus is accelerated after transient forebrain ischemia in mice. *Brain Res* 831, 283-7.
- Tanapat, P., Hastings, N. B., Reeves, A. J. Gould, E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci* 19, 5792-801.
- Tanapat, P., Hastings, N. B., Rydel, T. A., Galea, L. A. Gould, E. (2001). Exposure to fox odor inhibits cell proliferation in the hippocampus of adult rats via an adrenal hormone-dependent mechanism. *J Comp Neurol* 437, 496-504.
- Tashiro, A., Sandler, V. M., Toni, N., Zhao, C. Gage, F. H. (2006). NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442, 929-33.
- Temprana, S. G., Mongiat, L. A., Yang, S. M., Trinchero, M. F., Alvarez, D. D., Kropff, E., Giacomini, D., Beltramone, N., Lanuza, G. M. Schinder, A. F. (2015). Delayed coupling to feedback inhibition during a critical period for the integration of adult-born granule cells. *Neuron* 85, 116-30.
- Thurston, V. C., Zinkowski, R. P. Binder, L. I. (1996). Tau as a nucleolar protein in human nonneural cells in vitro and in vivo. *Chromosoma* 105, 20-30.
- Toni, N., Laplagne, D. A., Zhao, C., Lombardi, G., Ribak, C. E., Gage, F. H. Schinder, A. F. (2008). Neurons born in the adult dentate gyrus form functional synapses with target cells. *Nat Neurosci* 11, 901-7.
- Toni, N. y Sultan, S. (2011). Synapse formation on adult-born hippocampal neurons. *Eur J Neurosci* 33, 1062-8.
- Trojanowski, J. Q., Schuck, T., Schmidt, M. L. Lee, V. M. (1989). Distribution of tau proteins in the normal human central and peripheral nervous system. *J Histochem Cytochem* 37, 209-15.
- Tucker, K. L., Meyer, M. Barde, Y. A. (2001). Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci* 4, 29-37.

- van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., Gage, F. H. (1999a). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13427-31.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F. H. (1999b). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2, 266-70.
- van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci* 1, 191-8.
- van Praag, H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D., Gage, F. H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-4.
- Vershinin, M., Carter, B. C., Razafsky, D. S., King, S. J., Gross, S. P. (2007). Multiple-motor based transport and its regulation by Tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 87-92.
- Wakade, C. G., Mahadik, S. P., Waller, J. L., Chiu, F. C. (2002). Atypical neuroleptics stimulate neurogenesis in adult rat brain. *J Neurosci Res* 69, 72-9.
- Wang, Y., Loomis, P. A., Zinkowski, R. P., Binder, L. I. (1993). A novel tau transcript in cultured human neuroblastoma cells expressing nuclear tau. *J Cell Biol* 121, 257-67.
- Waterhouse, E. G., An, J. J., Orefice, L. L., Baydyuk, M., Liao, G. Y., Zheng, K., Lu, B., Xu, B. (2012). BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. *J Neurosci* 32, 14318-30.
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1858-62.
- Wickersham, I. R., Lyon, D. C., Barnard, R. J., Mori, T., Finke, S., Conzelmann, K. K., Young, J. A., Callaway, E. M. (2007). Monosynaptic restriction of transsynaptic tracing from single, genetically targeted neurons. *Neuron* 53, 639-47.
- Winner, B., Kohl, Z., Gage, F. H. (2011) Neurodegenerative disease and adult neurogenesis. *Eur J Neurosci* 33, 1139-51.
- Wintzer, M. E., Boehringer, R., Polygalov, D., McHugh, T. J. (2014). The hippocampal CA2 ensemble is sensitive to contextual change. *J Neurosci* 34, 3056-66.
- Witte, H., Neukirchen, D., Bradke, F. (2008). Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* 180, 619-32.
- Wong, E. Y., Herbert, J. (2006). Raised circulating corticosterone inhibits neuronal differentiation of progenitor cells in the adult hippocampus. *Neuroscience* 137, 83-92.
- Wu, D. M., Schneiderman, T., Burgett, J., Gokhale, P., Barthel, L., Raymond, P. A. (2001). Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2115-24.
- Xu, Z., Hou, B., Zhang, Y., Gao, Y., Wu, Y., Zhao, S., Zhang, C. (2009). Antidepressive behaviors induced by enriched environment might be modulated by glucocorticoid levels. *Eur Neuropsychopharmacol* 19, 868-75.
- Yu, Y., Run, X., Liang, Z., Li, Y., Liu, F., Liu, Y., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Gong, C. X. (2009). Developmental regulation of tau phosphorylation, tau kinases, and tau phosphatases. *J Neurochem* 108, 1480-94.
- Yuan, A., Kumar, A., Peterhoff, C., Duff, K., Nixon, R. A. (2008). Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J Neurosci* 28, 1682-7.
- Zhang, C. L., Zou, Y., He, W., Gage, F. H., Evans, R. M. (2008). A role for adult TLX-positive neural stem cells in learning and behaviour. *Nature* 451, 1004-7.
- Zhao, C., Teng, E. M., Summers, R. G., Jr., Ming, G. L., Gage, F. H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26, 3-11.
- Zupanc, G. K., Horschke, I. (1995). Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J Comp Neurol* 353, 213-33.

ANEXO

Boronate-Tau Mediated Uptake in Neurons

Mar Pérez^a, Raquel Cuadros^{b,c}, Noemi Pallas-Bazarra^{b,c}, Carlos García^b, Elena Langa^{b,c},
Jerónimo Jurado-Arjona^{b,c}, Félix Hernández^{b,c} and Jesús Avila^{b,c,*}

^a*Departamento de Anatomía Histología y Neurociencia, Facultad de Medicina UAM, Madrid, Spain*

^b*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Madrid, Spain*

^c*Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain*

Accepted 8 November 2013

Abstract. We modified tau protein with boronic acid to facilitate its delivery into non neural or neural cultured cells lacking tau protein. Our results indicate that the incorporated tau promotes the formation of cytoplasmic extensions in non-neuronal cells, as well as the appearance of neurites in cultured tau knockout hippocampal neurons. In addition, boronated tau is incorporated into hippocampal neurons of tau knockout mice after intracranial injection *in vivo*. These findings describe a novel method to deliver exogenous tau protein into cells.

Keywords: Boronic acid, protein delivery, tau protein

INTRODUCTION

The main role of the cell membrane is to act as an impermeable barrier, a role that is fundamental for cell survival. As such, the cell membrane hinders the direct delivery of proteins into a cell. However, intracellular delivery of proteins can be achieved by binding the proteins of interest (cargo proteins) to cell-permeating peptides, of which several candidates have been proposed, including: the transactivating transcriptional activator (Tat) from the human immunodeficiency virus [1, 2], the antennapedia homeodomain from *Drosophila* [3], homeodomains from mice [4], and homopolymers such as polyarginine [5]. These cell permeable peptides may contain a higher proportion of positively-charged amino acids (e.g., arginine), or they may promote the formation of an amphipathic α -helical structure in a hydrophobic environment (involving alternating patterns of polar and non-polar amino acids). However, the suitability of these peptides

as intracellular vectors also depends on the characteristics of the cargo to be delivered (e.g., size and charge), which in many cases are unsuitable.

Recently, an alternative means of intracellular protein delivery was proposed that involves modification of the protein prior to its delivery, promoting the formation of an ester with boronic acid [6]. Such boronated proteins can then interact with cell membrane polysaccharides and enter the cell (see Supplementary Figure 1), as has been successfully demonstrated for the delivery of bovine pancreatic ribonuclease A to cultured mammalian cells [6]. In the present study, we used this protein delivery method to introduce tau, a cytoskeletal protein that plays a key role in Alzheimer's disease [7], into cultured cells. We found that boronated tau promoted cytoplasmic extensions in non-neuronal cells, and it facilitated the appearance of neurites in cultured hippocampal neurons.

MATERIALS AND METHODS

Materials

5-amino-2-hydroxymethylphenylboronic acid was purchased from Combi-Blocks (San Diego, CA USA),

*Correspondence to: Jesús Avila, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Calle Nicolás Cabrera 1, Campus de Cantoblanco UAM, 28049 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 1964564; Fax: +34 91 1964420; E-mail: javila@cbm.uam.es.

the anti-Tau HT7 antibody from Thermo Scientific (cat. N° MN100), the anti-tubulin antibody YL1/2 from Serotec (cat. N° MCA77G) and the anti- β -tubulin antibody Ab196 previously characterized by Armas-Portela et al. [8]. Alexa-conjugated secondary antibodies were obtained from Invitrogen. DEAE cellulose was obtained from Pharma Fine Chemicals and GSK3 β from Sigma (cat N° G1663). The human tau protein containing exons 2, 3, and 10 was expressed in bacteria (*E. coli* strain BL21 [9]) and purified as described previously [10, 11].

Animals

Generation of the tau knockout mouse line has been previously described [12]. Mice were maintained in a temperature-controlled environment on a 12/12 h light–dark cycle and with *ad libitum* access to food and water. Mice were housed under standard laboratory conditions in accordance with European Community Guidelines (directive 86/609/EEC). All animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the national animal welfare bodies (Universidad Autónoma de Madrid and CSIC, the Higher Scientific Research Council), and all animal work was approved by the Bioethics Committee at the Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”.

Cell culture

African green monkey kidney fibroblast (COS-7) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum, antibiotics (streptomycin and penicillin), and glutamine (2 mM). When the cells reached 50 \pm 60% confluency, we added tau and boronated tau at concentrations of 0.5 mg/ml for 4 h in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 5% fetal calf serum.

Primary cultures of hippocampal neurons

Cells were obtained from the hippocampus of C57BL/6 and tau-knockout mouse embryos on embryonic day 18 (E18) as described previously [13], with minor modifications. Cells were dissociated using the Papain Dissociation System (PDS; Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA), and neurons were seeded on poly-L-lysine (100 μ g/ml)-coated plastic plates or glass coverslips and maintained in B-27/N2 Neurobasal medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 0.5 mM glutamine and

antibiotics. The cells were then grown in a humidified incubator at 37°C and 5% CO₂.

Analysis of cells bearing neurites

COS-7 cells treated with or without boronated tau were fixed after 4 h. Processes with lengths equivalent to two or more diameters of a cell body were scored as cytoplasmic extensions. At least 100 cells were measured per culture and each experiment was repeated three times. Primary cultures of neuronal cells from wild-type mice and homozygous tau knockout mice were fixed after 8 h. Processes with lengths equivalent to two or more diameters of a cell body were scored as neurites. At least 100 cells were measured per culture and each experiment was repeated three times.

Cell death assay

Cell death was assayed using the LIVE/DEAD viability/cytotoxicity kit (Invitrogen, Carlsbad, CA), which labels live cells with calcein AM and cells with a compromised plasma membrane integrity (i.e., dead cells) with ethidium homodimer-1. After staining, live (calcein-labeled, green) and dead (ethidium homodimer-1-labeled, red) cells were visualized using a Leica fluorescence microscope and images were acquired. The number of dead cells in each condition was expressed as a percentage of the total number of cells. Tau and boronated tau were employed at concentrations of 0.5 mg/ml.

Immunocytochemistry

For confocal microscopy, cells were grown on glass coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min and washed with phosphate buffered saline (PBS). The cells were then blocked with 1% FBS/0.1% Triton X-100-PBS and the coverslips were washed again in PBS. The washed coverslips were then incubated with the following primary antibodies: HT7 (1:250) and Ab196 (1:1000) for 2 h at room temperature, washed again with PBS and incubated with the appropriate secondary antibody for 45 min. All the coverslips were finally counterstained for 3 min with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:1000, Calbiochem-EMD Darmstadt, Germany). After washing with PBS, the coverslips were mounted with FluorosaveTM (Calbiochem, San Diego, CA). Confocal images were obtained using a TCS SP5 Spectral Leica Confocal microscope using an oil-immersion 63X objective with sequential-acquisition setting.

Electron microscopy

Samples were incubated on a carbon-coated grid for 2 min and then stained with 2% (wt/vol) uranyl acetate for 1 min. Transmission electron microscopy was performed using a JEOL model 1200EX electron microscope operated at 100 kV. Electron micrographs were obtained at a magnification of 40,000X on Kodak SO-163 film and they were digitized using an Eikonix IEEE-488 camera with a pixel size equivalent to 7 Å in the specimen plane. Processing and measurements were performed using Digital Micrograph 2.1 software (Gatan). Several standards were used as controls when obtaining measurements.

Tubulin polymerization

Temperature-dependent assembly of tubulin isolated from cow brain [14] was achieved in one microtubule polymerization cycle, after which tubulin was isolated by phosphocellulose chromatography [15]. The purified protein was mixed with recombinant tau protein in its unmodified form and the mixture was incubated for 30 min at 37°C. Changes in the A₃₅₀ absorbance were measured as previously described [16] and the polymerized protein was separated from the unpolymerized protein by centrifugation for 20 min at 25°C in a Beckman Airfuge at maximum speed. The polymerized protein and the supernatant were further analyzed in Western blots probed with the anti-tubulin antibody YL1/2.

Tau boronation

Boronation of tau was performed over varying durations as described previously [6] (see scheme in Supplementary Figure 1). The localization of the modified residues was determined by mass spectrometry, which revealed an increase of 113 Da per modified residue that corresponded to the incorporation of 5-amino-2-hydroxymethylphenyl boronic acid. In the majority of experiments shown here, tau was boronated for 30 min and after boronation, the protein was dialyzed against 50 mM MES [pH 6.4], 1 mM EGTA, 0.5 mM MgCl₂ (buffer A). After subjecting the tau to chromatography in a DEAE cellulose column equilibrated in the same buffer, it was eluted from the column with buffer A also containing 1 M NaCl. Finally, prior to use, boronated tau was dialyzed against a solution containing 0.1 M MES [pH 6.4], 2 mM EGTA, and 1 mM MgCl₂. Boronated tau was added to cell cultures at a concentration of 0.1–0.5 mg/ml and it was used *in*

vivo at a concentration 1 mg/ml. In some experiments, boronated tau was labeled with the sulfoindocyanine dye Cy5 (Amersham Biosciences) using the protocol provided by the commercial house.

In vivo delivery of boronated tau

Boronated human tau (1 mg/ml, 2 µL) was injected into the hippocampal CA3 region of tau-knockout mice. The point of injection in the CA3 with coordinates (mm) relative to Bregma in the anteroposterior, mediolateral, and dorsoventral planes were as follows: –1.25, 1.5, and 1.5 respectively. Seven days after injection the mice were sacrificed and their brain removed. Serial slices (400 µm) were obtained from the injection site and surrounding region and the distribution of human tau was determined by immunofluorescence.

RESULTS

Boronation of tau in vitro

Boronate can be incorporated into the acidic, glutamic, and aspartic residues of proteins. When considering the sequence of the largest human tau isoform (see Fig. 1A) [17], we divided this into four regions (exons 1–3, 4–8, 9–11, and 12–13) and identified 24 acidic residues in the first region, 14 in the second, 5 in the third, and 13 in the fourth. To determine which of these residues can be boronated, tau was incubated with boronic acid [6] for varying periods and the modified proteins were analyzed by mass spectrometry. When tryptic peptides containing boronated residues were analyzed (Supplementary Figure 2), their appearance varied in function of the length of incubation (Fig. 1B). After the longest incubation with boronic acid (40 h), a total of 18 modified acidic (glutamic, E; aspartic, D) residues were detected in the longest human tau isoform.

Boronated tau facilitates the in vitro assembly of tubulin into microtubules

As tau is a microtubule-associated protein, we investigated the effect of boronation on this particular function of the protein. To this end, we performed an *in vitro* analysis of tubulin assembly in the presence or absence of boronated tau. Tubulin assembly was monitored by three different methods: A) by analyzing changes in turbidity; B) by isolating and quantifying the amount of assembled protein following

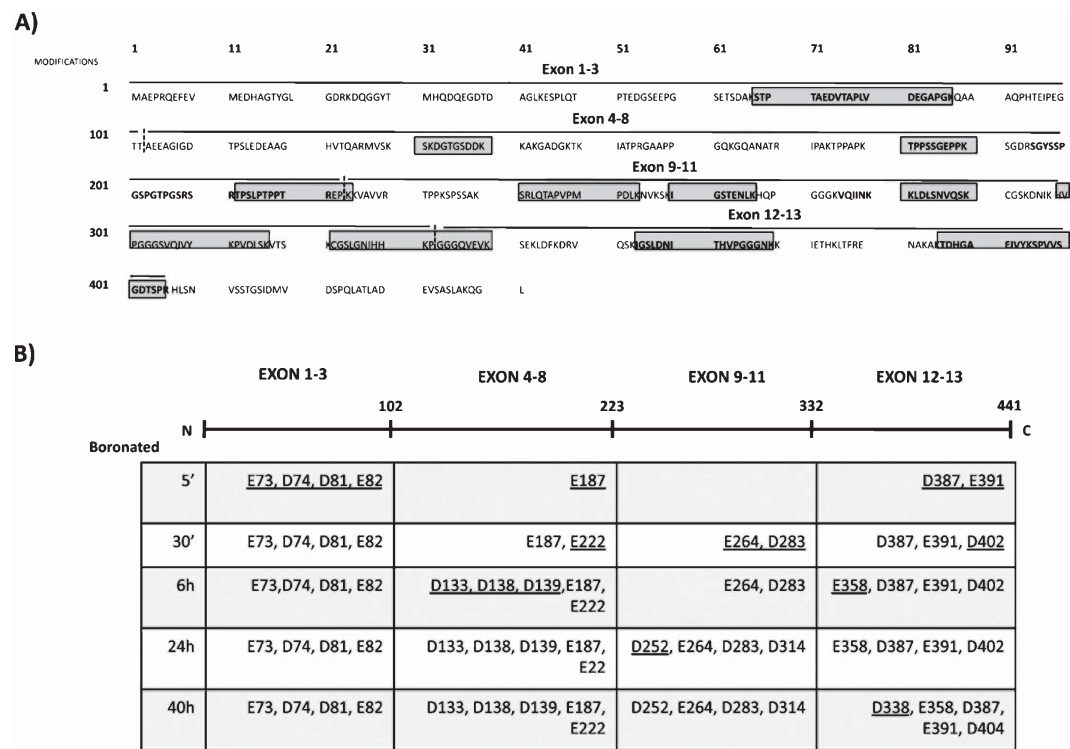


Fig. 1. Localization of boronated residues in the tau molecule. A) The largest human central neurons system tau isoform was divided into four regions containing exons 1–3, 4–8, 9–11, and 12–13 (vertical dotted lines). Tryptic peptides containing boronated residues are shown in shaded boxes. B) Boronation was carried out for varying periods (5 min, 30 min, 6 h, 24 h and 40 h) and the modified residues identified. The residues underlined appear in a modified form for the first time, at the times indicated.

centrifugation; and C) by electron microscopy analysis of microtubule polymers.

The effects of the addition of unmodified and modified tau on an increase in tubulin solution turbidity were assessed. Figure 2A shows how boronated tau did not affect microtubule polymerization. Furthermore, in the presence of both unmodified and boronated tau, there was a similar increase in the number of tubulin aggregates after centrifugation of the assembled protein (Fig. 2B–D). No tubulin aggregates were detected in the absence of exogenous tau and boronated tau alone was not pelleted following centrifugation in our experimental conditions. Finally, the formation of polymerized microtubules was visualized by electron microscopy and these structures were evident in the presence of both unmodified and boronated tau, but not in the absence of either tau protein (Fig. 2E–G).

Boronated tau can be delivered into cultured mammalian cells without toxic effects

The addition of boronated tau (incubated for 24 h with boronic acid) to cultured COS-7 cells exerted no

toxic effects and it did not affect cell viability (Table 1). Confocal microscopy analysis revealed that the modified form of tau (incubated for 6 h with boronic acid) was internalized by the COS-7 cells, and it was distributed in a punctuate pattern (Fig. 3Ab and Ab). This pattern resembles that described following the delivery of boronated RNase A [6] and it may reflect the uptake of the protein by endocytosis upon binding to cell-membrane polysaccharides.

The presence of boronated tau in COS-7 cells increases the formation of cytoplasmic extensions

One of the main functions of tau is to stabilize the assemblies of microtubules in cultured cells [18], an effect that may result in the formation of cytoplasmic extensions [19]. When we quantified the number of these extensions following the addition of boronated tau to cultured COS-7 cells (Fig. 3B), a higher percentage of cells exposed to boronated tau bore cytoplasmic extensions (equal or longer than twice the diameter length of a cell nucleus) than in untreated cultures.

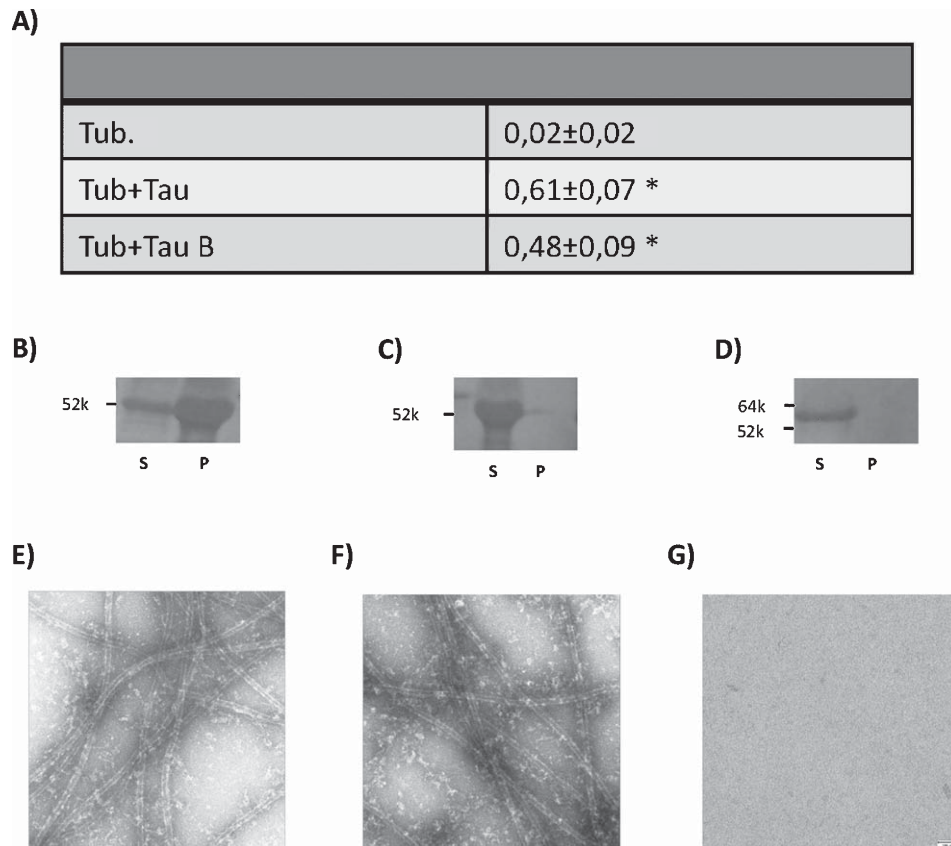


Fig. 2. Boronated tau facilitates tubulin assembly. A) Turbidity upon microtubule polymerization in the presence or absence of tau protein. Phosphocellulose-purified rat tubulin (2 mg/ml) was mixed with unmodified tau (0.3 mg/ml) or boronated tau (0.5 mg/ml) in a buffer containing 0.1 M MES [pH 6.4], 2 mM EGTA, 1 mM MgCl₂ and 0.1 mM GTP. The mixture was incubated for 30 min at 37°C and the absorbance at 350 nm was measured at the beginning (zero value) and end of the incubation. The data represent the mean values from three different experiments. Soluble and polymerized tubulin incubated in the presence or absence of boronated tau was fractionated by centrifugation for 5 min at 150,000×g in a Beckman Airfuge at room temperature: **p* < 0.05. B) Gel electrophoresis of Supernatant (S) and Pelleted (P) protein from the mixture containing tubulin and boronated tau, stained with Coomassie Blue. C) Supernatant (S) and pellet (P) of the mixture containing tubulin alone. D) Supernatant (S) and pellet (P) of the mixture containing boronated tau alone (1.5 mg/ml) in the same buffer. Microtubule polymers assembled in the presence of boronated tau. E) Using the protocol described above, incubation of unmodified tau and tubulin resulted in the formation of microtubules. F) A similar result was observed for the mixture of boronated tau and tubulin. G) In the absence of tau, purified tubulin was unable to assemble into microtubules.

Table 1
Analysis of cell viability in COS-7 cells

Treatment	Green (alive)	Red (death)
Boronic acid (see Methods)	550 ± 12	10 ± 2
Tau	600 ± 14	20 ± 3
Boronated Tau	650 ± 16	23 ± 4
Phospho Tau	550 ± 13	13 ± 2

Boronated tau is incorporated into hippocampal neurons of tau knockout mice

We next delivered boronated tau to cultured hippocampal neurons from wild type and tau-deficient mice. The appearance of neurites is delayed in hip-

pocampal neuronal cultures of tau-deficient mice with respect to wild type neurons [12, 20] and after 8 h in culture, we detected neurites on 42% of wild type neurons but on only 18% of tau-deficient neurons. When cells were cultured in the presence of boronated tau (Fig. 4A, right panels), the percentage of wild type neurons bearing neurites increased to 65%, while neurites were also evident on 52% of tau-deficient neurons (Fig. 4B). These tau-deficient neurons readily incorporated boronated tau (Fig. 4A), whereas unmodified tau was only incorporated into approximately 1% of neurons (data not shown). In the latter cells, the incorporation of unmodified tau may be explained by the interaction of unmodified tau with muscarinic cell

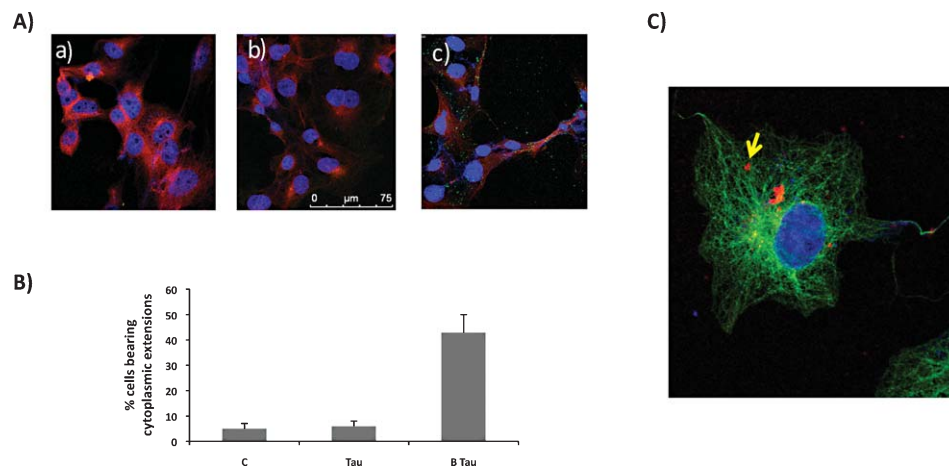


Fig. 3. Boronated but not unmodified tau is incorporated into non-neuronal cells. A) COS-7 cells were incubated in the absence (a) or presence (b) of unmodified or (c) boronated tau. Tau incorporation in COS-7 cells was monitored using an antibody (HT7 in green) raised against human tau. The localization of microtubules and nucleus was determined by immunofluorescence with antibody Ab196 against β_2 -tubulin and DAPI, respectively. B) Number of cytoplasmic extensions (equal or longer than twice the diameter length of the cell nucleus) in control cells (c) or treated with unmodified tau (tau) or boronated tau (B-Tau). C) High magnification showing partial co-localization (arrows) of boronated tau (red) with microtubules (green). Here boronated tau was labeled with Cy5 as described in materials and methods.

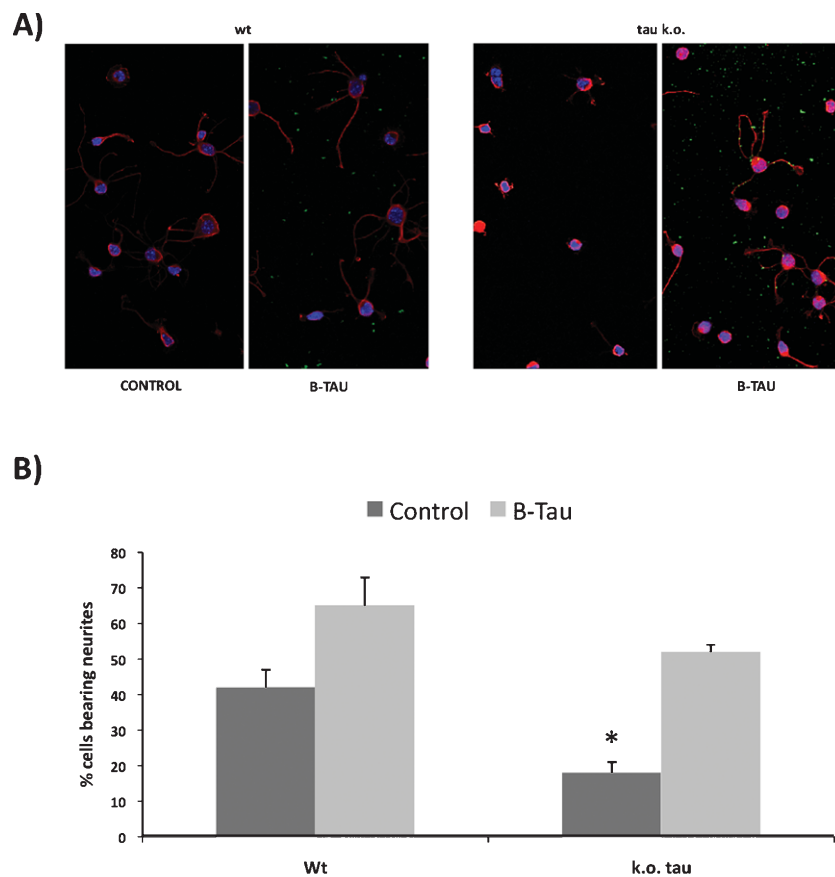


Fig. 4. Incorporation of boronated tau into hippocampal neurons from wild type (wt) and tau-knockout (tau k.o.) mice. A) Mouse wild type or tau-knockout hippocampal neurons were cultured in the absence (control) or presence of human boronated tau (B-Tau) and the number of cells bearing neurites was quantified after 8 h (stage 2 according to the classification system of Banker and colleagues [24]). B) Quantification of neurite-bearing neurons in absence (control) or presence of boronated tau (B-Tau); * $p < 0.05$ versus wild type.

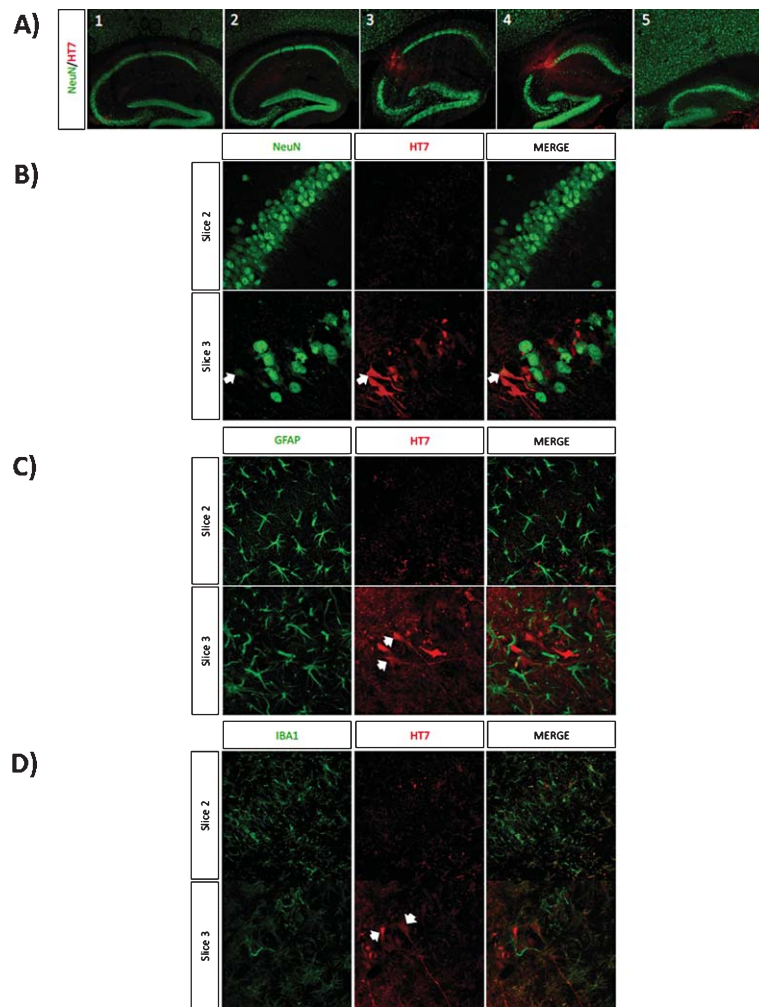


Fig. 5. Incorporation of boronated tau *in vivo*. A) Boronated human tau (1 mg/ml) was injected into the hippocampal CA3 region of tau-knockout mice. The point of injection in the CA3 with coordinates (mm) relative to Bregma in the anteroposterior, mediolateral, and dorsoventral planes were as follows: -1.25 , 1.5 and 1.5 , respectively. Seven days after injection mice were sacrificed and their brain removed. Serial slices, 1 to 5 ($400\ \mu\text{m}$), were obtained from the injection site and surrounding region and the distribution of human tau was determined by immunofluorescence (in red). B) Boronated tau was incorporated into neurons (see arrow), identified by the neuronal marker, NeuN (green). C, D) Tau was not detected in glial cells, identified using the astrocyte marker GFAP (green in C; arrows show a cell stained for tau but not with abGFAP) or the microglia marker IBA-1 (green in D; arrows show a cell stained for tau but not with IBA-1).

receptors present on neurons, which could facilitate its internalization inside the cell [21] along with the receptor itself [22].

In vivo delivery of boronated tau

Finally, we attempted to deliver boronated tau into the brain of tau-deficient mice *in vivo* [12]. Boronated human tau was injected intracranially into the hippocampus (CA3; Fig. 5A) and its incorporation into cells was analyzed by immunofluorescence. Tau was mainly incorporated into neurons and, in some neu-

rons, we detected co-localization of human tau and the neuronal marker NeuN (Fig. 5B). By contrast, we did not find a co-localization of human tau with glial markers (Fig. 5C, D).

After injection of boronated tau, three distinct neuronal populations were observed: 1) a group of neurons that failed to incorporate boronated tau or that incorporated less tau than could be detected by immunofluorescence; 2) a second population of healthy neurons that incorporated boronated tau; and finally, 3) a third population of neurons that incorporated significantly more boronated tau and that

appeared to exert toxic effects, evident as decreased NeuN expression.

DISCUSSION

Boronation is a rapid chemical procedure that modifies several acidic residues in the tau molecule within minutes. As tau is an intrinsically disordered protein, we expected that the most modified regions would correspond to those containing more acidic residues. However, after dividing the tau molecule into four regions containing different proportions of acidic residues, we observed a similar degree of boronic acid incorporation in all regions. This suggests that specific regions of the tau molecule are more accessible to the boronate moiety than others. After 30-min incubation with boronic acid, modifications were observed in the two residues of the first and second tubulin-binding repeats. Although these repeats have the highest capacity to bind to microtubules *in vitro* [23], this modification had no effect on the ability of tau to bind tubulin and boronated tau facilitates microtubule assembly.

We found that boronated tau was incorporated into cultured non-neuronal cells and once inside the cell, it appeared to facilitate the formation of cytoplasmic extensions in a manner similar to that described for unmodified tau in non-neuronal cells [19]. Surprisingly, our preliminary results suggest that boronation of tau impaired its phosphorylation *in vitro* by GSK3. Indeed, some boronization sites (E264, E358 and D402) are close to major phosphorylation sites (S262, S356 and S404). In its phosphorylated form, the ability of tau to bind to microtubules may be dampened and it may be more toxic [7]. Our results suggest that the intracellular delivery of boronated tau could prevent the formation of phosphorylated tau and promote certain tau functions, such as microtubule assembly.

Intracellular delivery of boronated tau also facilitated the formation of neurites, mainly in cultures from hippocampal neurons of tau-deficient mice. We have also demonstrated *in vivo* delivery of boronated tau. Thus, we injected a highly concentrated tau solution (1 mg/ml) into the brain of tau-deficient mice to ensure that there was sufficient delivered protein that could be detected by immunofluorescence. However, high intracellular tau concentrations may be toxic and accordingly, a compromise must be reached when administering boronated tau *in vivo* to minimize such toxicity. In our experimental conditions, we observed three distinct neuronal populations: one containing an excess of tau; another in which less tau had been

incorporated; and a third population that failed to incorporate tau. Thus, further studies will be necessary to devise a method for uniform *in vivo* delivery of tau with minimal toxic effects.

Taken together, the findings presented here describe a novel method to deliver tau protein into cells, demonstrating that exogenous tau has the capacity to induce neurite formation. These findings have significant implications for conditions in which tau function is dysregulated, as occurs in tauopathies like Alzheimer's disease.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by grants from the Spanish Ministry of Health (SAF 2011-24841), the Comunidad de Madrid (S2010/BMD2331), the Fundación BBVA, MICINN and by an institutional grant from the Fundación R. Areces.

Authors' disclosures available online (<http://www.j-alz.com/disclosures/view.php?id=2018>).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary figures are available in the electronic version of this article: <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-131655>.

REFERENCES

- [1] Green M, Loewenstein PM (1988) Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein. *Cell* **55**, 1179-1188.
- [2] Frankel AD, Pabo CO (1988) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* **55**, 1189-1193.
- [3] Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, Prochiantz A (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1864-1868.
- [4] Kong KA, Gadi J, Park HW, Bok J, Kim MH (2008) The third helix of the murine Hoxc8 homeodomain facilitates protein transduction in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 161-164.
- [5] Fonseca SB, Pereira MP, Kelley SO (2009) Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 953-964.
- [6] Ellis GA, Palte MJ, Raines RT (2012) Boronate-mediated biologic delivery. *J Am Chem Soc* **134**, 3631-3634.
- [7] Avila J, Lucas JJ, Perez M, Hernandez F (2004) Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev* **84**, 361-384.
- [8] Armas-Portela R, Parrales MA, Albar JP, Martinez AC, Avila J (1999) Distribution and characteristics of betaII tubulin-enriched microtubules in interphase cells. *Exp Cell Res* **248**, 372-380.
- [9] Perez M, Valpuesta JM, Medina M, Montejo de Garcini E, Avila J (1996) Polymerization of tau into filaments in the

- presence of heparin: The minimal sequence required for tau-tau interaction. *J Neurochem* **67**, 1183-1190.
- [10] Medina M, Montejo de Garcini E, Avila J (1995) The role of tau phosphorylation in transfected COS-1 cells. *Mol Cell Biochem* **148**, 79-88.
- [11] Moreno FJ, Medina M, Perez M, Montejo de Garcini E, Avila J (1995) Glycogen synthase kinase 3 phosphorylates recombinant human tau protein at serine-262 in the presence of heparin (or tubulin). *FEBS Lett* **372**, 65-68.
- [12] Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI, Vitek MP (2001) Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci* **114**, 1179-1187.
- [13] Banker GA, Cowan WM (1977) Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* **126**, 342-397.
- [14] Shelanski ML, Gaskin F, Cantor CR (1973) Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 765-768.
- [15] Williams RC Jr, Detrich HW, 3rd (1979) Separation of tubulin from microtubule-associated proteins on phosphocellulose. Accompanying alterations in concentrations of buffer components. *Biochemistry* **18**, 2499-2503.
- [16] Gaskin F, Cantor CR, Shelanski ML (1974) Turbidimetric studies of the *in vitro* assembly and disassembly of porcine neurotubules. *J Mol Biol* **89**, 737-755.
- [17] Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: Sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* **3**, 519-526.
- [18] Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 1858-1862.
- [19] Drubin DG, Kirschner MW (1986) Tau protein function in living cells. *J Cell Biol* **103**, 2739-2746.
- [20] de Barreda EG, Dawson HN, Vitek MP, Avila J (2010) Tau deficiency leads to the upregulation of BAF-57, a protein involved in neuron-specific gene repression. *FEBS Lett* **584**, 2265-2270.
- [21] Gomez-Ramos A, Diaz-Hernandez M, Rubio A, Miras-Portugal MT, Avila J (2008) Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci* **37**, 673-681.
- [22] Lamah J, Philip M, Sharma YK, Moro O, Ramachandran J, Sadee W (1992) Hm1 muscarinic cholinergic receptor internalization requires a domain in the third cytoplasmic loop. *J Biol Chem* **267**, 13406-13412.
- [23] Goode BL, Denis PE, Panda D, Radeke MJ, Miller HP, Wilson L, Feinstein SC (1997) Functional interactions between the proline-rich and repeat regions of tau enhance microtubule binding and assembly. *Mol Biol Cell* **8**, 353-365.
- [24] Dotti CG, Banker GA, Binder LI (1987) The expression and distribution of the microtubule-associated proteins tau and microtubule-associated protein 2 in hippocampal neurons in the rat in situ and in cell culture. *Neuroscience* **23**, 121-130.

Review Article**Tau and Neuron Aging****Jesus Avila^{1,2*}, Elena Gomez de Barreda^{1,2}, Noemi Pallas-Bazarra^{1,2}, Felix Hernandez^{1,2}**¹ Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, 28049 Madrid, Spain.² Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Spain.

[Received November 16, 2012; Revised November 28, 2012; Accepted November 29, 2012]

ABSTRACT: Tau protein could appear like a family of multiple isoforms rising by alternative splicing of its nuclear RNA or by different posttranslational modifications. The levels (or proportion) of these different tau isoforms could change in different neurons during development, aging or disease (tauopathies) in mammals. It is discussed that in some disorders there is a gain of toxic function of modified tau, due to the phosphorylation or aggregation of tau protein. These phenotypic changes are mainly found in aging organisms. On the other hand, loss of tau function could facilitate the appearance of some defects (related to iron toxicity) in aging animals lacking tau.

Key words: Tau isoforms, posttranslational modifications, Alzheimer disease.

Tau is a microtubule associated protein mainly present in neurons. There is a unique human tau gene located on chromosome 17 [1]. The chromosome loci 17q 21.31, where gene tau is present, contains a common inversion polymorphism of around 900kb. It results in the presence of two different haplotypes for tau gene (MAPT). These haplotypes are known like H1 and H2 haplotypes. The first, H1, haplotype is associated with an increased expression of tau protein. Thus, an important feature about tau genetics is the presence of these two haplotypes, H1 and H2, in which there is an inversion of a segment, containing tau gene, in H2 chromosome with respect to its H1 counterpart [2]. Also, copy number variations affecting tau gene involving partial deletion and complete duplication of the gene have been described [3].

Tau gene is transcribed into nuclear RNA. This nuclear RNA yields different mRNA species by alternative splicing to generate a protein family of different tau isoforms containing different number of exons [4]. In the central nervous system, there are different tau isoforms containing or lacking exons 2, 3 and 10 [5]. Mainly, the characteristics of those tau isoforms containing or lacking exon 10 have been

compared, because exon 10 encodes for one of the tau regions involved in the binding of tau to microtubules. Indeed, there is a cluster, in tau protein, of four microtubule binding regions containing similar but not identical sequences of 31 or 32 residues [6] and the third one of them is encoded by exon 10 (Figure 1). Thus, depending on the presence or absence of exon 10, there is a tau isoform containing four (tau 4R) or three (tau 3R) microtubule binding regions, being the binding of tau 4R to microtubules stronger than that of tau 3R.

In this review, we will comment on the function of tau isoforms and their modification during aging or disease.

Tau function

In the first studies, tau was discovered as a microtubule associated protein and by analysis *in vitro*, or in cultured cells, it was described that tau facilitates tubulin assembly into microtubules [7]; that tau stabilizes polymerized microtubules [8-10]; or that tau could suppress microtubule dynamics [11]. Also, tau binding to microtubules appears to be through its interaction with protofilaments and, recently, has been suggested that tau

*Correspondence should be addressed to: Dr. Jesús Avila, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Calle Nicolás Cabrera 1, Campus de Cantoblanco UAM, 28049 Madrid, Spain. E-mail: javila@cbm.uam.es

protein could diffuse along the microtubule lattice [12]. Tau protein shares some of these features with other microtubule associated proteins (MAPs). However, there are some specific differences between tau and other MAPs. One of these differences is the appearance of tau during neuron development. Tau is expressed later than other MAPs during development as it appears in the neuron when the developing cell is closed to the time required for maturation and when the newborn neuron is almost ready to contact with other neurons [13].

Other specific functions for tau protein have been suggested. The functions involve the binding of tau to some proteins related to axonal transport [14-16]; the binding of tau to proteins involved in tubulin acetylation

[17, 18]. Tau could also bind to dendritic proteins [19], or to mitochondria [20, 21].

To study tau function in a living organism, mice lacking tau have been raised to compare their phenotype with that of wild type (wt) mice [22, 23]. Young mice lacking tau are viable and with a similar phenotype to that of wt mice, showing only minor differences in behavior [24] or gene expression [25]. However, some changes have been found in aged animals (see below). To explain the viability of tau deficient mice, it has been suggested that the lack of some tau functions, like microtubule stability could be compensated, by the presence of other MAPs doing similar functions [22].

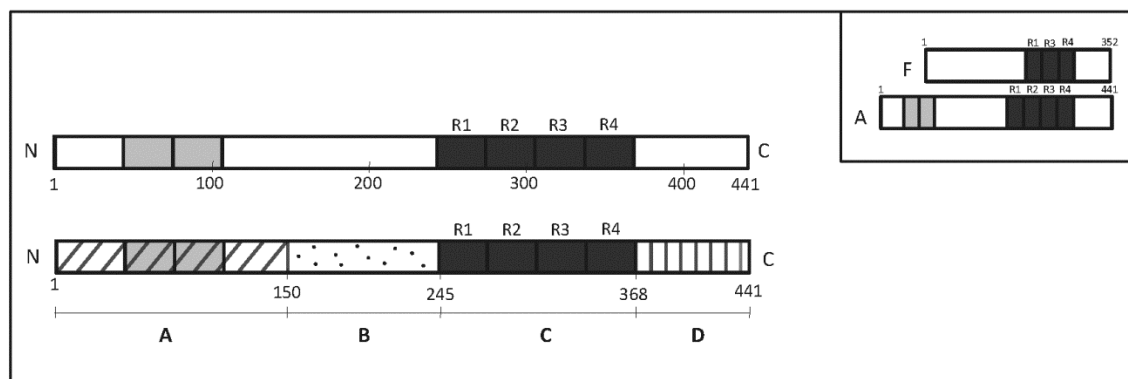


Figure 1. Scheme of tau molecule. Upper part is showing the longest central nervous system human tau isoform. In gray, the presence of two exons (2 and 3) is indicated and, in black, that of the four similar, but not identical (R1 to R4) tubulin binding regions. Lower part shows tau molecule divided in four parts. (A) Indicates the most variable parte of the molecule, when tau molecules from different organism are compared. (B) Shows a proline rich region that could be highly modified by phosphorylation. (C) Indicates the tubulin binding region. (D) Shows the C-terminal region that could be also modified by phosphorylation, at several residues. Inset shows the shortest and longest human tau isoforms. The first is mainly present in fetal (F) brain whereas the second is present in adult (A) brain.

Tau in neuron development

As previously indicated, tau is expressed later than other MAPs during neuron development, being fetal tau mainly composed of tau 3R isoforms. Also newborn cells, raised in adult neurogenesis at the dentate gyrus, contain a high proportion of tau 3R isoforms [26]. In addition fetal tau could be highly modified by phosphorylation not only during development [27], but also in adult neurogenesis [28]. Later on, adult neurons contains tau isoforms with exon 10 (tau 4R) and with a lower level of phosphorylation compared to that of fetal tau.

Tau and neuron aging

The age for many of the central nervous neurons of a mammal, like human or mouse is that of the age of the organism. Only there are some few younger neurons that arise in the adult organism in some specific sites, like dentate gyrus, but mainly the majority of neurons aged with their organisms. A consequence of that aging is an increase of neuron vulnerability to oxidative damage, a damage that could result in the appearance of peroxidation products [29] that could modify tau protein [30, 31], a modification that could facilitate tau aggregation [32, 33]. Also during aging, brain changes in

mitochondria could take place [34] and it has been described that a mitochondrial protein, DRP1, involved in mitochondrial fission, could abnormally bind to tau, promoting neurodegeneration through mitochondrial dysfunction [21].

Aging is the main risk for several neurodegenerative disorders like Alzheimer or Parkinson disease. In Alzheimer disease (AD) is well known, from long time ago, that there is an increase in the amount of tau, an increase in tau phosphorylation and an increase in tau aggregation in the brain of the patients affected with the disease [35]. It appears that the increase in the amount of tau is not due to an increase in the synthesis of the protein but to an impairment of its degradation by the proteasome or by autophagy pathways [36]. In the process of tau degradation, some heat shock proteins could be involved [37] to coordinate tau homeostasis or function in an isoform specific manner [38]. Recently, it has been suggested that a posttranslational modification, tau acetylation, may also decrease tau degradation because acetylation of some lysine residues in tau molecule could prevent their ubiquitination, a modification that could be required for the degradation of tau via proteasome [39, 40].

In AD tau becomes increasingly phosphorylated at many different sites [41]. This phosphorylation may detach tau from microtubules and facilitate itself aggregation [42]. Tau could be modified by several kinases and dephosphorylated by several phosphatases [27]. One of the main tau kinases is GSK3, a kinase that could be activated by the presence of beta amyloid peptide, probably in oligomeric form [43-46]. Not only tau phosphorylation could facilitate tau aggregation but also other modification, tau truncation, could induce the aggregation of tau [47, 48]. On the other hand, the possible toxic role of filamentous tau aggregates is under discussion [48].

Intracellular phosphorylated tau could be toxic [49], but also amyloid peptide toxicity could be modulated by tau protein [50-53]. In other neurodegenerative disorders, tauopathies, there is also the presence of phosphotau and tau aggregates that could be toxic for neurons. Different tau aggregates and filaments (paired or straight) could be present in different diseases, raising by different composition of tau isoforms (tau 3R and tau 4R) or by different posttranslational tau modifications [32, 54] in those tau aggregates. Also, the presence of tau mutations could be the primary cause for the onset of some of these diseases [26, 35].

In Parkinson disease, the absence of tau function could contribute to toxic iron accumulation in areas like the substantia nigra. It has been indicated that tau couples with amyloid precursor protein to export iron from neuronal cells [55] and the absence of tau function

may result in iron accumulation, an accumulation that could be toxic in old animals.

A consequence of the neuron toxicity in these neurodegenerative disorders is the presence of neuron death and, intracellular tau could be released to the extracellular space where it could be toxic to the surrounding neurons [56].

Toxicity of extracellular tau

Extracellular tau, raised after neuron death, could become toxic after binding to specific cell receptors present in surrounding neurons. These receptors have been identified as the muscarinic M1 and M3 receptors [57, 58]. The result of that interaction of tau with muscarinic receptors is an increase in intracellular calcium [59].

On the other hand, it has been reported that tau spreading from neuron to neuron could take place in the absence of neuron death in an exocytosis-endocytosis manner in cell or animal models [60, 61]. More recently, it has been suggested that tau could be transferred from one neuron to neighboring neurons through synaptic contacts [62, 63]. To study if any of these ways for tau spreading, from neuron to neuron, may take place in humans, a preliminary study based in the analysis of the nature of tau protein, present in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients was carried out. The result of this analysis showed that uncoated tau (probably arising from neuron death), but also vesicle secreted tau (compatible with the transfer from neuron to neuron through exocytosis and endocytosis) are present in the cerebrospinal fluid of AD patients [64].

In summary, tau protein, the product of a single gene, could yield to the formation of different isoforms by alternative splicing of its nuclear RNA or by posttranslational modifications. The level of these tau isoforms could change during the development, aging or disease in mammals. In this way, aging is the main risk for the onset of several neurodegenerative diseases including some tauopathies, like Alzheimer disease.

Acknowledgements

This study was funded by grants from the Spanish Ministry of Health (SAF 2011-24841), Comunidad de Madrid (S2010/BMD2331), Fundación M. Botín and an institutional grant from Fundación R. Areces. The authors are grateful to Nuria de la Torre for her technical assistance.

References

- [1] Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM and Donlon TA (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res*, 387: 271-280
- [2] Caffrey TM and Wade-Martins R (2012). The role of MAPT sequence variation in mechanisms of disease susceptibility. *Biochem Soc Trans*, 40: 687-692
- [3] Rovelet-Lecrux A and Campion D (2012). Copy number variations involving the microtubule-associated protein tau in human diseases. *Biochem Soc Trans*, 40: 672-676
- [4] Himmler A (1989). Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol*, 9: 1389-1396
- [5] Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW and Martin DW, Jr. (1989). Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol*, 9: 1381-1388
- [6] Lee G, Cowan N and Kirschner M (1988). The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science*, 239: 285-288
- [7] Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY and Kirschner MW (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72: 1858-1862
- [8] Drubin DG and Kirschner MW (1986). Tau protein function in living cells. *J Cell Biol*, 103: 2739-2746
- [9] Caceres A and Kosik KS (1990). Inhibition of neurite polarity by tau antisense oligonucleotides in primary cerebellar neurons. *Nature*, 343: 461-463
- [10] Brandt R and Lee G (1993). Functional organization of microtubule-associated protein tau. Identification of regions which affect microtubule growth, nucleation, and bundle formation in vitro. *J Biol Chem*, 268: 3414-3419
- [11] Panda D, Goode BL, Feinstein SC and Wilson L (1995). Kinetic stabilization of microtubule dynamics at steady state by tau and microtubule-binding domains of tau. *Biochemistry*, 34: 11117-11127
- [12] Hinrichs MH, Jalal A, Brenner B, Mandelkow E, Kumar S and Scholz T (2012). Tau protein diffuses along the microtubule lattice. *J Biol Chem*,
- [13] Couchie D and Nunez J (1985). Immunological characterization of microtubule-associated proteins specific for the immature brain. *FEBS Lett*, 188: 331-335
- [14] Dixit R, Ross JL, Goldman YE and Holzbaur EL (2008). Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science*, 319: 1086-1089
- [15] Ebner A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B and Mandelkow E (1998). Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *J Cell Biol*, 143: 777-794
- [16] Yuan A, Kumar A, Peterhoff C, Duff K and Nixon RA (2008). Axonal transport rates in vivo are unaffected by tau deletion or overexpression in mice. *J Neurosci*, 28: 1682-1687
- [17] Perez M, Santa-Maria I, Gomez de Barreda E, Zhu X, Cuadros R, Cabrero JR, Sanchez-Madrid F, Dawson HN, Vitek MP, Perry G, Smith MA and Avila J (2009). Tau--an inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *J Neurochem*, 109: 1756-1766
- [18] Ding H, Dolan PJ and Johnson GV (2008). Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J Neurochem*, 106: 2119-2130
- [19] Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wolfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E and Gotz J (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142: 387-397
- [20] Manczak M and Reddy PH (2012). Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Hum Mol Genet*, 21: 2538-2547
- [21] DuBoff B, Gotz J and Feany MB (2012). Tau promotes neurodegeneration via DRP1 mislocalization in vivo. *Neuron*, 75: 618-632
- [22] Harada A, Oguchi K, Okabe S, Kuno J, Terada S, Ohshima T, Sato-Yoshitake R, Takei Y, Noda T and Hirokawa N (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature*, 369: 488-491
- [23] Dawson HN, Ferreira A, Eyster MV, Ghoshal N, Binder LI and Vitek MP (2001). Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice. *J Cell Sci*, 114: 1179-1187
- [24] Ikegami S, Harada A and Hirokawa N (2000). Muscle weakness, hyperactivity, and impairment in fear conditioning in tau-deficient mice. *Neurosci Lett*, 279: 129-132
- [25] Barreda EG and Avila J (2011). Tau regulates the subcellular localization of calmodulin. *Biochem Biophys Res Commun*, 408: 500-504
- [26] Goedert M, Spillantini MG, Potier MC, Ulrich J and Crowther RA (1989). Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J*, 8: 393-399
- [27] Avila J, Lucas JJ, Perez M and Hernandez F (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev*, 84: 361-384
- [28] Fuster-Matanzo A, de Barreda EG, Dawson HN, Vitek MP, Avila J and Hernandez F (2009). Function of tau protein in adult newborn neurons. *FEBS Lett*, 583: 3063-3068
- [29] Sayre LM, Zelasko DA, Harris PL, Perry G, Salomon RG and Smith MA (1997). 4-Hydroxynonenal-derived

- advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 68: 2092-2097
- [30] Yan SD, Chen X, Schmidt AM, Brett J, Godman G, Zou YS, Scott CW, Caputo C, Frappier T, Smith MA and et al. (1994). Glycated tau protein in Alzheimer disease: a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91: 7787-7791
- [31] Ledesma MD, Bonay P, Colaco C and Avila J (1994). Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J Biol Chem*, 269: 21614-21619
- [32] Perez M, Cuadros R, Smith MA, Perry G and Avila J (2000). Phosphorylated, but not native, tau protein assembles following reaction with the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal. *FEBS Lett*, 486: 270-274
- [33] Reynolds MR, Lukas TJ, Berry RW and Binder LI (2006). Peroxynitrite-mediated tau modifications stabilize preformed filaments and destabilize microtubules through distinct mechanisms. *Biochemistry*, 45: 4314-4326
- [34] Swerdlow RH (2011). Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1812: 1630-1639
- [35] Lee VM, Goedert M and Trojanowski JQ (2001). Neurodegenerative tauopathies. *Annu Rev Neurosci*, 24: 1121-1159
- [36] Wang Y and Mandelkow E (2012). Degradation of tau protein by autophagy and proteasomal pathways. *Biochem Soc Trans*, 40: 644-652
- [37] Koren J, 3rd, Jinwal UK, Lee DC, Jones JR, Shults CL, Johnson AG, Anderson LJ and Dickey CA (2009). Chaperone signalling complexes in Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, 13: 619-630
- [38] Voss K, Combs B, Patterson KR, Binder LI and Gamblin TC (2012). Hsp70 alters tau function and aggregation in an isoform specific manner. *Biochemistry*, 51: 888-898
- [39] Cohen TJ, Guo JL, Hurtado DE, Kwong LK, Mills IP, Trojanowski JQ and Lee VM (2011). The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation. *Nat Commun*, 2: 252
- [40] Min SW, Cho SH, Zhou Y, Schroeder S, Haroutunian V, Seeley WW, Huang EJ, Shen Y, Masliah E, Mukherjee C, Meyers D, Cole PA, Ott M and Gan L (2010). Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron*, 67: 953-966
- [41] Hanger DP, Anderton BH and Noble W (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med*, 15: 112-119
- [42] Alonso AC, Grundke-Iqbal I and Iqbal K (1996). Alzheimer's disease hyperphosphorylated tau sequesters normal tau into tangles of filaments and disassembles microtubules. *Nat Med*, 2: 783-787
- [43] Townsend M, Mehta T and Selkoe DJ (2007). Soluble A β inhibits specific signal transduction cascades common to the insulin receptor pathway. *J Biol Chem*, 282: 33305-33312
- [44] Tackenberg C and Brandt R (2009). Divergent pathways mediate spine alterations and cell death induced by amyloid-beta, wild-type tau, and R406W tau. *J Neurosci*, 29: 14439-14450
- [45] Magdesian MH, Carvalho MM, Mendes FA, Saraiva LM, Juliano MA, Juliano L, Garcia-Abreu J and Ferreira ST (2008). Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem*, 283: 9359-9368
- [46] Tokutake T, Kasuga K, Yajima R, Sekine Y, Tezuka T, Nishizawa M and Ikeuchi T (2012). Hyperphosphorylation of Tau Induced by Naturally Secreted Amyloid-beta at Nanomolar Concentrations Is Modulated by Insulin-dependent Akt-GSK3 β Signaling Pathway. *J Biol Chem*, 287: 35222-35233
- [47] Mena R, Edwards PC, Harrington CR, Mukaetova-Ladinska EB and Wischik CM (1996). Staging the pathological assembly of truncated tau protein into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 91: 633-641
- [48] Avila J (2010). Alzheimer disease: Caspases first. *Nat Rev Neurol*, 6: 587-588
- [49] Gomez de Barreda E, Perez M, Gomez Ramos P, de Cristobal J, Martin-Maestro P, Moran A, Dawson HN, Vitek MP, Lucas JJ, Hernandez F and Avila J (2010). Tau-knockout mice show reduced GSK3-induced hippocampal degeneration and learning deficits. *Neurobiol Dis*, 37: 622-629
- [50] Rapoport M, Dawson HN, Binder LI, Vitek MP and Ferreira A (2002). Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 6364-6369
- [51] Gotz J, Chen F, van Dorpe J and Nitsch RM (2001). Formation of neurofibrillary tangles in P301 τ transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science*, 293: 1491-1495
- [52] Santacruz K, Lewis J, Spire T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M and Ashe KH (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*, 309: 476-481
- [53] Nussbaum JM, Schilling S, Cynis H, Silva A, Swanson E, Wangsanut T, Tayler K, Wiltgen B, Hatami A, Ronicke R, Reymann K, Hutter-Paier B, Alexandru A, Jagla W, Graubner S, Glabe CG, Demuth HU and Bloom GS (2012). Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid-beta. *Nature*, 485: 651-655
- [54] Zhong Q, Congdon EE, Nagaraja HN and Kuret J (2012). Tau isoform composition influences rate and extent of filament formation. *J Biol Chem*, 287: 20711-20719
- [55] Lei P, Ayton S, Finkelstein DI, Spoerri L, Cicciotosto GD, Wright DK, Wong BX, Adlard PA, Cherny RA, Lam LQ, Roberts BR, Volitakis I, Egan GF, McLean CA, Cappai R, Duce JA and Bush AI (2012). Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by

- impairing APP-mediated iron export. *Nat Med*, 18: 291-295
- [56] Gomez-Ramos A, Diaz-Hernandez M, Cuadros R, Hernandez F and Avila J (2006). Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Lett*, 580: 4842-4850
- [57] Gomez-Ramos A, Diaz-Hernandez M, Rubio A, Miras-Portugal MT and Avila J (2008). Extracellular tau promotes intracellular calcium increase through M1 and M3 muscarinic receptors in neuronal cells. *Mol Cell Neurosci*, 37: 673-681
- [58] Diaz-Hernandez M, Gomez-Ramos A, Rubio A, Gomez-Villafuertes R, Naranjo JR, Miras-Portugal MT and Avila J (2010). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase promotes the neurotoxicity effect of extracellular tau. *J Biol Chem*, 285: 32539-32548
- [59] Gomez-Ramos A, Diaz-Hernandez M, Rubio A, Diaz-Hernandez JI, Miras-Portugal MT and Avila J (2009). Characteristics and consequences of muscarinic receptor activation by tau protein. *Eur Neuropsychopharmacol*, 19: 708-717
- [60] Frost B, Jacks RL and Diamond MI (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem*, 284: 12845-12852
- [61] Clavaguera F, Bolmont T, Crowther RA, Abramowski D, Frank S, Probst A, Fraser G, Stalder AK, Beibel M, Staufenbiel M, Jucker M, Goedert M and Tolnay M (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol*, 11: 909-913
- [62] de Calignon A, Polydoro M, Suarez-Calvet M, William C, Adamowicz DH, Kopeikina KJ, Pitstick R, Sahara N, Ashe KH, Carlson GA, Spires-Jones TL and Hyman BT (2012). Propagation of tau pathology in a model of early Alzheimer's disease. *Neuron*, 73: 685-697
- [63] Liu L, Drouet V, Wu JW, Witter MP, Small SA, Clelland C and Duff K (2012). Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS One*, 7: e31302
- [64] Saman S, Kim W, Raya M, Visnick Y, Miro S, Jackson B, McKee AC, Alvarez VE, Lee NC and Hall GF (2012). Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 287: 3842-3849

GSK3 and β -catenin determines functional expression of sodium channels at the axon initial segment

Mónica Tapia · Ana Del Puerto · Alberto Puime · Diana Sánchez-Ponce ·
Laure Fronzaroli-Molinieres · Noemí Pallas-Bazarra · Edmond Carlier ·
Pierre Giraud · Dominique Debanne · Francisco Wandosell · Juan José Garrido

Received: 16 January 2012 / Revised: 21 May 2012 / Accepted: 12 June 2012
© Springer Basel AG 2012

Abstract Neuronal action potentials are generated through voltage-gated sodium channels, which are tethered by ankyrinG at the membrane of the axon initial segment (AIS). Despite the importance of the AIS in the control of neuronal excitability, the cellular and molecular mechanisms regulating sodium channel expression at the AIS remain elusive. Our results show that GSK3 α/β and β -catenin phosphorylated by GSK3 (S33/37/T41) are localized at the AIS and are new components of this essential neuronal domain. Pharmacological inhibition of GSK3 or β -catenin knockdown with shRNAs decreased the levels of phosphorylated- β -catenin, ankyrinG, and voltage-gated sodium channels at the AIS, both “in vitro” and “in

vivo”, therefore diminishing neuronal excitability as evaluated via sodium current amplitude and action potential number. Thus, our results suggest a mechanism for the modulation of neuronal excitability through the control of sodium channel density by GSK3 and β -catenin at the AIS.

Keywords β -catenin · Axon initial segment · GSK3 · AnkyrinG · Sodium channels

Introduction

After axonal specification, the development of the axon initial segment (AIS), characterized by a high density of voltage-gated Na⁺ and K⁺ channels, is critical in initiating and modulating action potentials [1, 2]. These ion channels and other AIS membrane proteins, such as neurofascin, are tethered by intracellular proteins, such as ankyrinG or PSD-93 [3–6]. The cytoskeleton of the AIS is characterized by ultrastructural features such as dense F-actin microfilaments or fasciculated microtubules, which are resistant to detergent extraction and display a higher degree of tubulin acetylation and detyrosination [7–11]. These characteristics confer on the AIS the ability to act as a barrier to membrane diffusion [11] and to cytoplasmic traffic [12, 13]. However, the signaling pathways regulating AIS functional maintenance remain largely unknown. AnkyrinG is necessary for maintaining the AIS [14] and seems to be essential for maintaining microtubule properties at the AIS [15] like CK2 and HDAC6 [9, 10].

GSK3 is a key kinase downstream of multiple regulatory pathways, and regulates microtubule dynamics, neuronal differentiation, axon guidance, axonal protein transport, as well as ion channel activity [16–19]. In addition to its function in regulating microtubule dynamics, GSK3 can

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00018-012-1059-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

M. Tapia · A. Del Puerto · D. Sánchez-Ponce ·
N. Pallas-Bazarra · J. J. Garrido (✉)
Department of Cellular, Molecular and Developmental
Neurobiology, Instituto Cajal, CSIC, Avenida Doctor Arce,
Madrid 28002, Spain
e-mail: jjgarrido@cajal.csic.es

M. Tapia · A. Del Puerto · D. Sánchez-Ponce ·
N. Pallas-Bazarra · F. Wandosell · J. J. Garrido
Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades
Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

A. Puime
Departamento de Anatomía Patológica, Capio Fundación
Jiménez Díaz, Madrid 28040, Spain

L. Fronzaroli-Molinieres · E. Carlier · P. Giraud · D. Debanne
INSERM U1072, Marseille 13344, France

L. Fronzaroli-Molinieres · E. Carlier · P. Giraud · D. Debanne
Aix-Marseille University, U1072, Marseille 13344, France

phosphorylate proteins detected at the AIS, such as the GABA receptor scaffolding protein gephyrin [20]. GSK3 also has an important function in β -catenin regulation, a multifaceted protein involved among other functions in cell structure.

β -catenin has been implicated in adhesion or transcription [21]. The regulation of these different functions is complex and controlled by differential phosphorylation of β -catenin or distinct protein interactions in different subcellular compartments. For example, a minor pool of β -catenin is phosphorylated by GSK3 β at S33, S37, and T41 [22], ubiquitinated after interaction with β TrCP E3 ligase and degraded by the proteasome [23]. However, recent studies have shown that β -catenin-pS33/37/T41 may not only be involved in degradation but also in determining signaling functions [24, 25]. In epithelial cells, β -catenin phosphorylated by GSK3 is localized at tight junctions 24, associated with APC at the leading edge of migrating cells [24], and is involved in microtubule re-growth at the centrosome [26]. β -catenin also forms a complex with N-cadherin, dynein/dynactin/p150, and the EB1 microtubule plus end protein at adherent junctions [27]. Besides cadherins, many β -catenin-binding proteins belong to the family of microtubule-related proteins [28]. In neurons, β -catenin has been reported to be a critical mediator of dendritic morphogenesis [29] and axonal growth [30]. β -catenin knock-out mice die in early embryonic development [31] and several conditional β -catenin knock-out have significantly impaired cranio-encephalic development or cortical and hippocampal development [32]. Moreover, β -catenin is also a binding partner of APC, a microtubule-binding protein and can regulate the level of APC clusters in neurite tips [33]. β -catenin also interacts with Ca^{2+} -activated K^{+} channels in presynaptic active zones [34].

In the present study, we found that β -catenin phosphorylated at S33/S37/T41 is progressively accumulated at the AIS during neuronal development. β -catenin-pS33/37/T41 tethered at the AIS shares the same characteristics as other AIS proteins, and its concentration at the AIS depends on the microtubule cytoskeleton. Moreover, we describe that GSK3 is localized at the AIS, and its inhibition, as well as the reduction of β -catenin expression by specific shRNAs, affects the normal clustering of ankyrinG and voltage-gated sodium channels at the AIS and reduces neuronal excitability. In conclusion, our results show that β -catenin and GSK3 play a role during functional maturation of the AIS.

Materials and methods

Cell culture

All protocols were approved by the institutional animal care and use committee following the guidelines of the

Council of Europe Convention ETS123, recently revised as indicated in the Directive 86/609/EEC. Hippocampal and cortical neurons were prepared as previously described [35]. The cells were plated on polylysine-coated coverslips (1 mg/ml) at a density of 7,500 cells/cm². 5 μM 1- β -D-arabinofuranosylcytosine (AraC) was added after 2 days in culture. For biochemical experiments, cortical neurons were plated at a density of 100,000 cells/cm², and cultured for 48 h. For the culture of neurons beyond 6 DIV, neurons were plated at a density of 5,000 cells/cm² and transferred to dishes containing astrocytes. Primary hippocampal neurons were nucleofected using the Amaxa nucleofector kit for primary mammalian neural cells (Amaxa Bioscience) according to the manufacturer's instructions. Nucleofection was performed using 3 μg total DNA and 3×10^6 cells for each nucleofection. Nucleofection efficiency was around 15 % of neurons, based on RFP protein expression.

Murine neuroblastoma N2a were originally obtained from the American Type Cell Culture (Neuro-2A, Reference: CCL131) and were grown at 37 °C in 7 % CO₂, in DMEM supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) and 2 mM glutamine. N2a cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Transfections were performed with 9 μl Lipofectamine 2000 and 3 μg plasmid DNA.

Reagents and plasmids

Interference RNA plasmids were obtained from Origene. Two different shRNA sequences against β -catenin and a scrambled shRNA were used, inserted into the pRFP-C-RS vector, which expresses the red fluorescent protein. An shRNA-AnkyrinG and scrambled sequence in pGFP-V-RS were used for ankyrinG [9]. Lithium chloride (LiCl), myo-inositol phosphate, Trichostatin A (TSA), and Nocodazole were from Sigma. GSK3 inhibitor X and GSK3 inhibitor AR-A014418 were from Calbiochem.

Immunocytochemistry

Hippocampal neurons were fixed in 4 % paraformaldehyde for 20 min. In some experiments, 15-DIV neurons were then treated with or without TSA for 48 h, and washed in phosphate buffer before extracting the cells with 0.5 % Triton X-100 in cytoskeletal buffer (2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 60 mM Pipes pH 7.0) for 10 min at 37 °C, modified from previous work [11]. After extraction, the neurons were rinsed and fixed in PFA 4 %. For immunodetection, the coverslips were treated for 10 min with 50 mM NH₄Cl and incubated in blocking buffer (0.22 % gelatin, 0.1 % Triton X-100 in PBS) for 30 min. Primary antibodies were

incubated for 1 h at room temperature in blocking buffer. The primary antibodies used were: mouse anti-acetylated- α -tubulin (1:2,000), mouse anti-tyrosinated- α -tubulin (1:2,000), mouse anti-MAP2 (1:400) and mouse anti-PanNaCh (1:75), mouse anti- α -tubulin (1:100) from Sigma; mouse anti-tau-1 (1:1,000), and rabbit anti-MAP2 (1:500) from Chemicon; mouse anti-ankyrinG (1:100) from NeuroMab; rabbit anti-pS33/S37T41- β -catenin (1:250), rabbit anti-pS45- β -catenin (1:200) and rabbit anti-pS32-I κ B α (1:250, 14D4) from Cell Signaling; mouse anti- β -catenin (1:500), mouse anti-N-cadherin (1:200) and mouse anti-EB1 (1:100) from BD Transduction, mouse anti-GSK3 α/β (1:1000) from Biosource (Life Technologies); mouse anti-APC (1:150) from Millipore; rabbit anti- β III tubulin (1:1,000) from Covance; rabbit anti- α -tubulin was kindly provided by Dr. Arevalo lab (Instituto Cajal), and chicken anti-MAP2 (1:10,000) from Abcam. The secondary antibodies used were a donkey anti-mouse or anti-rabbit Alexa-Fluor-488, 594 or 647 (1:500). F-actin was stained using Alexa-Fluor-594-conjugated Phalloidin (1:100). Nuclei were stained using TOPRO.

Images were acquired on a vertical Axioskop-2plus microscope (Zeiss) or a confocal microscope (LSM510, Zeiss) under the same conditions to compare intensities. Analysis of axon length and fluorescence intensities was performed with the NeuronJ and ImageJ software tools. Images were prepared for presentation using the Adobe CS3 software.

Immunohistochemistry

Brains from E18 embryos or P0, P5, and P12 mice were fixed overnight in 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) pH 7.2, cryoprotected in 30 % sucrose and frozen in Tissue-Tek mounting medium (Electron Microscopy Sciences). Brain sections (30 μ m) were obtained on a cryostat and collected in PB. The sections were permeabilized for 1 h in 0.1 M PB containing 0.5 % Triton X-100 and 10 % horse serum (GIBCO) and then incubated overnight at room temperature in the same solution containing rabbit anti-pS33/37T41- β -catenin (1:50) and mouse anti-ankyrinG (1:200) antibodies. Secondary antibodies were incubated for 1 h at room temperature. The samples were washed in PB and mounted on slides with Fluoromount-G. Some sections (5 μ m) were stained with Giemsa (Merck).

Western-blot analysis

Protein samples were prepared from high-density cortical neuron cultures and murine neuroblastoma N2a cells. The cells were lysed and homogenized in a buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 100 mM NaF,

1 % Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, 10 mM EDTA and Complete inhibitor protease cocktail (Roche Diagnostics). The proteins were then separated on 8 % SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies in blocking solution (PBS, 0.2 % Tween, 5 % non-fat milk or 10 % FBS). The antibodies used to probe the membranes were mouse anti- β -actin (1:5,000, Sigma); anti- β -catenin (1:800, BD Transduction); rabbit anti-pS33/S37T41- β -catenin (1:500) and GAPDH (1:2,000, Cell Signaling). Secondary antibodies were from Amersham. Antibody binding was then visualized by ECL (Amersham) and densitometry was performed with an imaging densitometer (GS-800, Bio-Rad).

Mouse brain slice cultures, plasmid GeneGun delivery, and electrophysiological recording

Slice cultures containing the hippocampus and entorhinal cortex were obtained from post-natal day 8 mice as previously reported [36]. Slices (300–350 μ m) were cut in sucrose-based slicing solution (280 mM sucrose, 26 mM NaHCO₃, 1.3 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 11 mM D-glucose, 50 mM phenol red, and 2 mM kynurenate) and were maintained for 1 h at room temperature in oxygenated (95 % O₂/5 % CO₂) standard artificial ACSF (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 0.8 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 50 mM phenol red, and 11 mM D-glucose). Each slice was placed on 20-mm latex membranes (Millicell) inserted into 35-mm Petri dishes containing 1 ml of culture medium (25 ml MEM, 12.5 ml HBSS, 12.5 ml horse serum, 0.5 ml penicillin/streptomycin, 0.8 ml glucose solution (1 M), 0.1 ml ascorbic acid solution (1 mg/ml), 0.4 ml HEPES (1 M), 0.5 ml B27, and 8.95 ml water) and maintained for up to 8–9 days in an incubator at 34 °C, 95 % O₂–5 % CO₂. To arrest glial proliferation, 5 μ M Ara-C was added to the culture medium starting at 3 days in vitro. The GSK-3 inhibitor, AR-A014418 (20 μ M), was added to cultured slices at 1 day in vitro and kept for 7 days. β -catenin shRNAs plasmids were delivered to brain slices using the Helyos gene-gun system (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Briefly, gold particles coated with scrambled or β -catenin shRNA were introduced into cells employing a high-velocity stream of helium (120 dpi) at 2 days in vitro and the slices were maintained for up to 7 days.

Whole-cell patch clamp recordings were obtained from CA3 or L5 pyramidal neurons. The external solution contained (mM): 125 NaCl, 26 NaHCO₃, 3 CaCl₂, 2.5 KCL, 2 MgCl₂, 0.8 NaH₂PO₄, and 10 D-glucose, and was equilibrated with 95 % O₂–CO₂. Patch pipettes (5–10 M Ω) were filled with a solution containing (mM): 120 potassium

gluconate, 20 KCl, 0.5 EGTA, 10 HEPES, 2 Na₂ATP, 0.3 NaGTP and 2 MgCl₂, pH 7.4. Recordings were made at 29 °C. The voltage and current signals were low-pass filtered (3 kHz) and acquisition of sequences (500–1,500 ms) was performed at a frequency of 0.1 Hz with P-clamp 8 or 10 (Axon Instruments). Sodium currents were evoked by a voltage step (50 ms) from −80 to −20 mV. The capacitive and leak components of the evoked current were subtracted with a conventional P/4 protocol. Intrinsic neuronal excitability was monitored with depolarizing current pulses (1 s) of increasing amplitude (from +10/+ 500 pA).

Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times and the results are presented as the mean and standard error of the mean (SEM) or standard deviation of the mean (SD) as indicated in figure legends. Statistical differences between experimental conditions were analyzed by *t* test or paired *t* test using the Sigmaplot 11.0 software.

Results

GSK3 phosphorylated β -catenin is enriched at the axon initial segment

Previous studies have shown a relationship between GSK3 phosphorylated β -catenin (S33/37/T41) and cell polarity [24, 25]. To test this hypothesis in neurons, we first studied the location of β -catenin-pS33/37/T41 in different developmental stages of hippocampal neurons using a phospho-specific antibody raised against β -catenin phosphorylated on the N-terminal Ser 33, Ser 37, and Thr 41, which specificity has been tested in a β -catenin knockout mouse at early developmental stages [37] and a β -catenin antibody that recognizes the C-terminal region. The specificity of phosphorylated β -catenin antibody was further confirmed by suppression of β -catenin expression with nucleofected β -catenin shRNAs (Supplementary Fig. 1) and β -catenin shRNAs expression resulted in the absence of β -catenin and β -catenin-pS33/37/T41 staining. At an early stage (24 h), we found β -catenin-pS33/37/T41 concentrated at soma (Fig. 1a) and at a higher levels at the centrosome of hippocampal neurons, as previously described in epithelial cells and neural progenitors (Supplementary Fig. 2; [26, 37]). β -catenin-pS33/37/T41 staining was also located all along the neurites, co-localizing with tubulin staining, while β -catenin antibody mainly stained the leading edge of neurites, colocalized with the F-actin-rich region (Fig. 1a). Following axonal elongation at 48 h, β -catenin-pS33/37/T41 was mainly polarized to the axon, even though a lower level of phospho- β -catenin still remained in the other neurites (Fig. 1b).

We then examined the expression of β -catenin-pS33/37/T41 at later stages of development. Interestingly, 3, 6, or 21-DIV (days in vitro) hippocampal neurons showed β -catenin-pS33/37/T41 staining concentrated at the AIS (Fig. 1c–e). AISs were identified by ankyrinG, voltage-gated sodium channel or the AIS marker 14D4 staining. The percentage of ankyrinG-positive AISs with colocalized β -catenin-pS33/37/T41 staining increased from $43 \pm 7\%$ at 3 DIV to $82 \pm 1\%$ at 7 DIV (Fig. 1f), and the same staining was maintained in older neurons (Fig. 1e). Fluorescence intensity along dendrites, soma, and axon at different developmental stages was quantified to confirm a higher AIS intensity fluorescence of β -catenin-pS33/37/T41 than in other regions of the neuron (Supplementary Fig. 3). On the other hand, β -catenin antibody stained dendrites and axons, and was also observed at the AIS (Fig. 1g). The differences in β -catenin antibodies staining may be due to molecular interactions in each neuronal region and antibody accessibility to the different epitopes. In fact, β -catenin phosphorylated at serine 45 is not located at the AIS, and is enriched in the nucleus of hippocampal neurons (Supplementary Fig. 4). This spatial uncoupling of β -catenin phosphorylation has been previously observed in epithelial cells [25]. Finally, treatment of 6-DIV hippocampal neurons with the proteasome inhibitor MG132 (50 nM) increased β -catenin-pS33/37/T41 levels at the soma, but did not change β -catenin-pS33/37/T41 levels at the AIS (Supplementary Fig. 5), suggesting that β -catenin-pS33/37/T41 may be protected by other proteins at the AIS.

We next analyzed the expression of β -catenin-pS33/37/T41 in developing mice brains from E18 to P12 (Fig. 2). Brain sections were stained using the polyclonal anti- β -catenin-pS33/37/T41 antibody and a monoclonal anti-ankyrinG antibody to identify axon initial segments (see “Materials and methods”). At E17–18, we did not detect any localization of β -catenin-pS33/37/T41 (data not shown) and AISs were not yet formed [38]. Some scattered AISs were detected at P0 (Fig. 2a), and at P5 and P12 β -catenin-pS33/37/T41 staining of AISs was progressively detected throughout the cortical plate to layer VI colocalized with ankyrinG staining (Fig. 2b, d) and in the pyramidal cell layer of CA1, CA2, and CA3 of the hippocampus (Fig. 2c).

β -catenin-pS33/37/T41 tethering at the AIS depends on AnkyrinG and AIS microtubules

In order to identify a molecular partner of phospho- β -catenin at the AIS, we first checked the localization of two known β -catenin-interacting proteins, N-cadherin and APC, which play an important role in adhesion complex and microtubule interactions, respectively. As shown in Supplementary Fig. 6, neither N-cadherin nor APC were identified at the AIS in 6-DIV neurons.

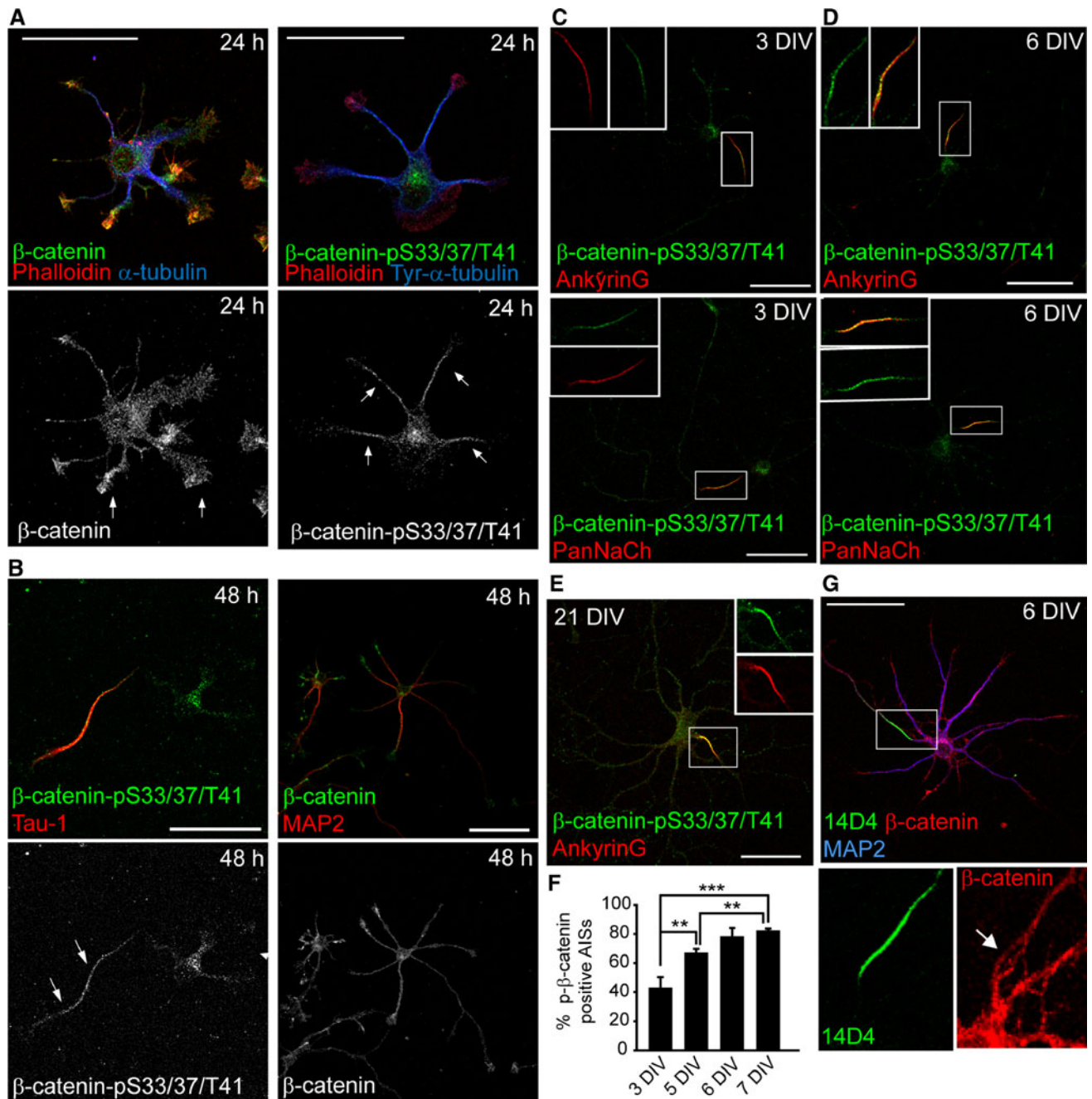


Fig. 1 β -catenin-pS33/37/T41 is concentrated at the axon initial segment in cultured hippocampal neurons. **a** Hippocampal neurons cultured for 24 h were stained for F-actin (red) and antibodies against α -tubulin (blue) and β -catenin (green) in left panels, and tyrosinated- α -tubulin (blue) and pS33/37/T41- β -catenin (green) in right panels. Arrows indicate higher β -catenin intensity fluorescence at the growth cone in left panels, while in right panels arrows indicate a tubulin-rich zone with high-intensity fluorescence of pS33/37/T41- β -catenin. Note the position of centrosome in neurons labeled with pS33/37/T41- β -catenin antibody in the right panel. **b** Hippocampal neurons cultured for 48 h were stained with pS33/37/T41- β -catenin or β -catenin (green) and with tau-1 (axon) or MAP2 (dendrites) antibodies (red). Arrows indicate the axon (**c**, **d**) 3-DIV and 6-DIV hippocampal neurons were stained with ankyrinG or PanNaCh (red)

and pS33/37/T41- β -catenin (green) antibodies. Both proteins are concentrated at the AIS region. Insets show enlarged views of overlapping β -catenin-pS33/37/T41 and AnkyrinG or PanNaCh staining at the AIS. **e** 21-DIV neurons stained with antibodies against AnkyrinG (red) and β -catenin-pS33/37/T41 (green). Box shows an amplification of the indicated axon initial segment. **f** Percentage of neurons that show β -catenin-pS33/37/T41 concentrated at the AIS relative to ankyrinG-positive AISs during neuronal differentiation. The graphs represent the mean of three independent experiments (500 neurons/experimental condition in each experiment). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, t test. **g** Triple immunostaining with β -catenin (red), 14D4 antibody (green), and MAP2 (blue) in 6-DIV neurons. Magnifications show β -catenin staining at the AIS recognized by the 14D4 antibody staining at the AIS. Scale bar 50 μ m

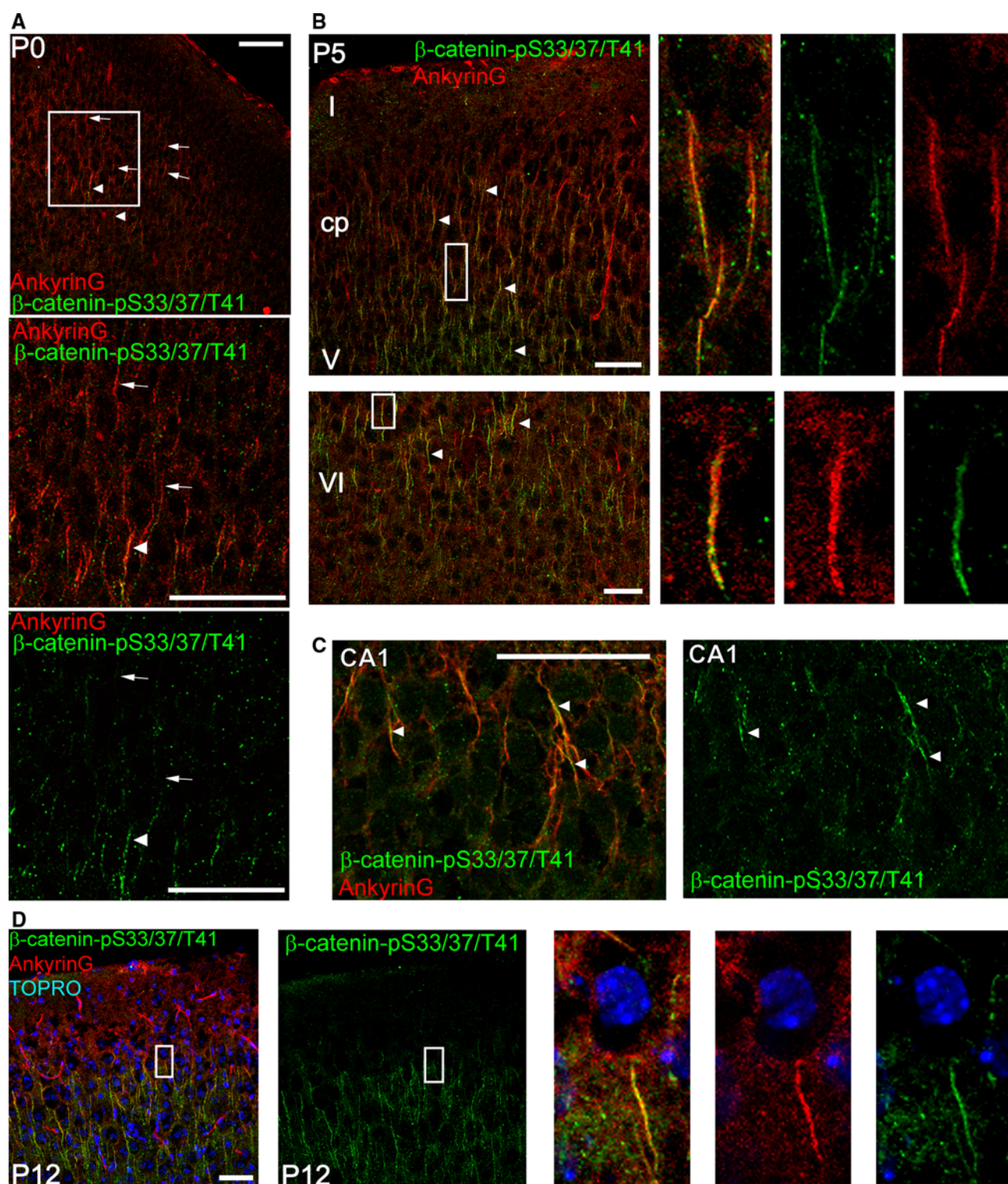


Fig. 2 β -catenin-pS33/37/T41 is enriched at the axon initial segment in vivo. **a, b** Photomicrographs obtained from sections showing cortical and subcortical layers from P0 (**a**) and P5 (**b**) mice brains. **c** Photomicrographs of the CA1 region of a P5 mouse hippocampus. Sections were stained with anti-ankyrinG (red) and anti- β -catenin-

pS33/37/T41 (green) antibodies. **d** Image of cortical section from P12 mouse showing β -catenin-pS33/37/T41 and ankyrinG colocalization at the AIS. Nuclei are stained with TOPRO stain. Arrows indicate ankyrinG immunolabeled AISs and arrowheads overlapping staining of β -catenin-pS33/37/T41 and ankyrinG at the AIS. Scale bar 50 μ m

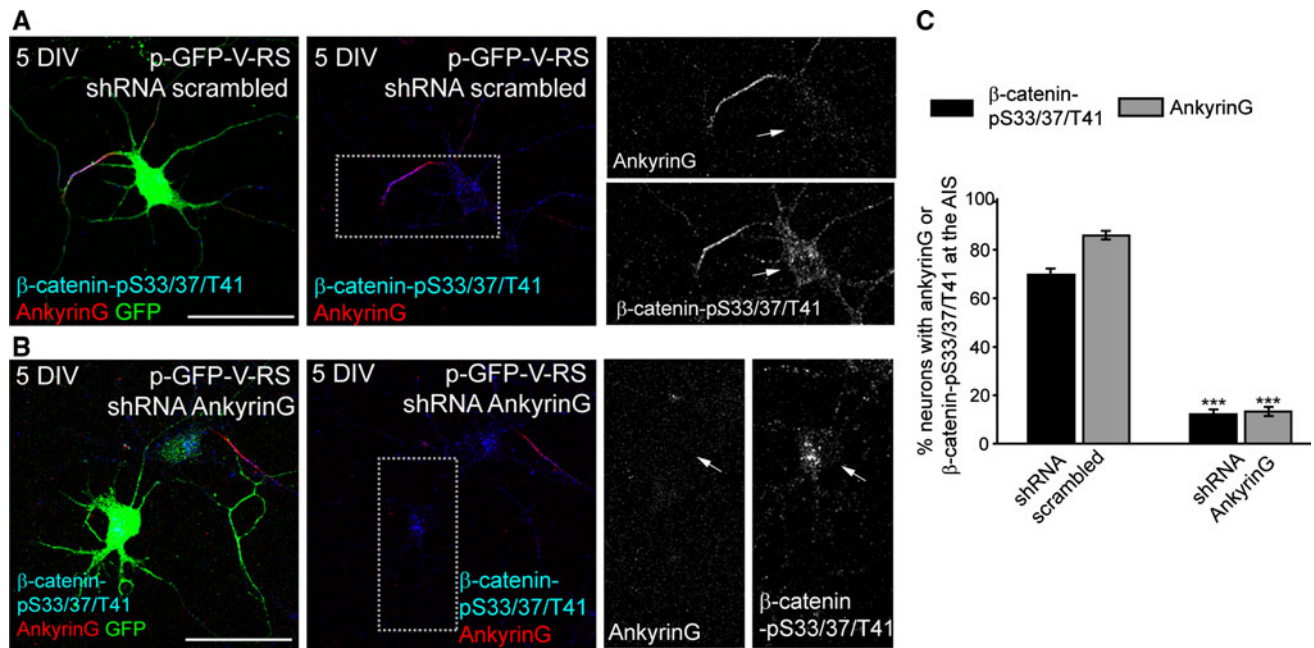


Fig. 3 AnkyrinG expression is necessary to localize β -catenin-pS33/37/T41 to the AIS. **a, b** 5-DIV hippocampal neurons nucleofected with GFP plasmids expressing scrambled shRNA (**a**) or ankyrinG shRNA (**b**). Neurons were immunostained with ankyrinG (red) and pS33/37/T41- β -catenin (green) antibodies. Enlarged views of the AIS are shown in right panels in gray scale. Arrows indicate the position

of the soma. **c** The graph represents the percentage of neurons with presence of ankyrinG (gray bars) or β -catenin-pS33/37/T41 (black bars) at the AIS in neurons nucleofected with scrambled or ankyrinG shRNAs. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments (50 neurons/experimental condition and experiment). *** $p < 0.001$, t test. Scale bar 50 μ m

We next evaluated whether β -catenin-pS33/37/T41 expression at the AIS was dependent on ankyrinG, which controls the clustering of most AIS proteins [4, 6, 9, 14, 39, 40]. Hippocampal neurons were nucleofected with a scrambled shRNA or with an ankyrinG shRNA [9] and maintained until 5 DIV. Neurons nucleofected with scrambled shRNA had both ankyrinG (85.93 ± 1.61 %) and β -catenin-pS33/37/T41 (69.75 ± 2.08 %) concentrated at the AIS (Fig. 3a, c). In contrast, only 13.19 ± 2.7 % and 12.04 ± 1.17 % of neurons nucleofected with ankyrinG shRNA showed ankyrinG and β -catenin-pS33/37/T41 concentration, respectively (Fig. 3b, c). Moreover, approximately 30 % of neurons nucleofected with ankyrinG shRNA displayed β -catenin-pS33/37/T41 staining concentrated in the soma. Thus, β -catenin-pS33/37/T41 tethering and location at the AIS depends on ankyrinG expression.

To better understand how β -catenin-pS33/37/T41 is anchored at the AIS, we analyzed the involvement of the cytoskeleton in the tethering of β -catenin-pS33/37/T41. As proteins tethered at the AIS, and also microtubules, are insoluble in non-ionic detergents [10, 41], 15-DIV neurons (Fig. 4a) were extracted in 0.5 % TX-100 at 37 °C before fixation. After extraction, voltage-gated sodium channels, ankyrinG, β -catenin-pS33/37/T41 and acetylated- α -tubulin microtubules were found to be concentrated and co-

localize at the AIS (Fig. 4b, d). In this context, we have previously shown that changes in microtubule acetylation produced by inhibition of a tubulin deacetylase (HDAC6) impair the tethering of ankyrinG and voltage-gated sodium channels at the AIS [10]. Fifteen-DIV neurons were treated with an HDAC inhibitor, Trichostatin A (TSA), for 48 h, extracted with detergent, and fixed. In these conditions, TSA-treated neurons showed acetylated- α -tubulin staining along the axon, and β -catenin-pS33/37/T41 staining showed a reduction at the AIS, and displayed an extended pattern along the axon (Fig. 4d), indicating that β -catenin-pS33/37/T41 tethering at the AIS depends not only in ankyrinG but also on the properties of AIS microtubules. We then treated 7-DIV neurons for 3 days with a low dose of a microtubule depolymerizing agent, nocodazole (10 nM). In order to evaluate the effects of nocodazole on microtubules, we used an antibody against EB1, a microtubule +TIP protein, also found at the AIS [42, 43]. In control 10-DIV neurons, EB1 was localized throughout the neuron with the characteristics comets, and at the AIS. Nocodazole-induced depolymerization of microtubules reduced EB1 labeling, as well as phospho- β -catenin labeling at the AIS (Fig. 4c). Hence, the changes observed in phospho- β -catenin staining suggest that β -catenin-pS33/37/T41 are related in somehow to changes in AIS microtubule integrity.

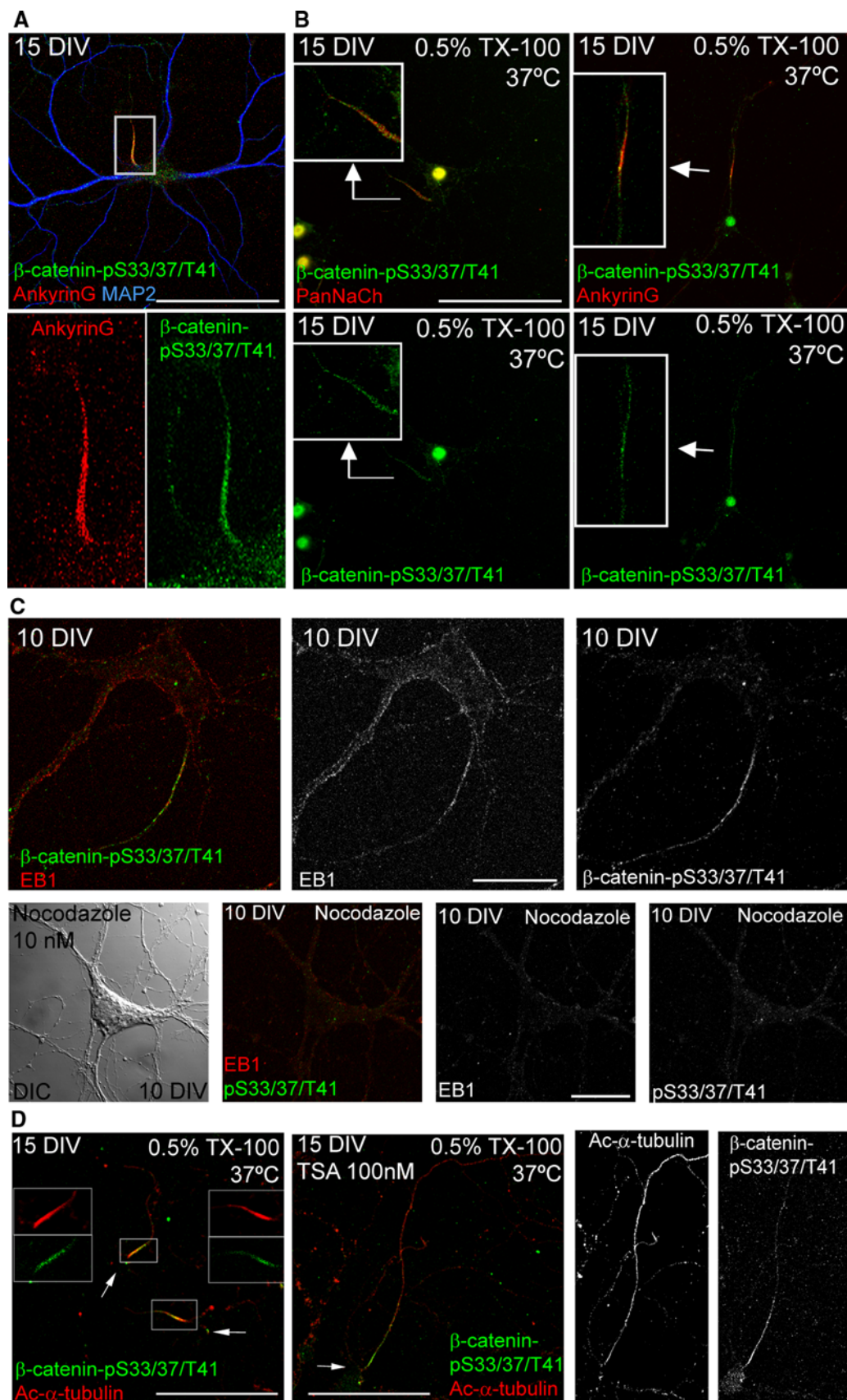


Fig. 4 β -catenin-pS33/37/T41 is resistant to detergent extraction at the AIS and its location depends on microtubules. **a** 15-DIV hippocampal neurons stained with antibodies against AnkyrinG (red) and β -catenin-pS33/37/T41 (green). Box indicates the amplified region of the AIS shown in lower panels. **b** 15-DIV hippocampal neurons treated with cytoskeletal buffer (see “Materials and methods” section) for 10 min at 37 °C. After fixation, neurons were stained with β -catenin-pS33/37/T41 and Pan-sodium channel antibodies (left panels) or β -catenin-pS33/37/T41 and ankyrinG antibodies (right panels). Insets show enlarged views of axon initial segments. **c** 10-DIV hippocampal neurons cultured in the absence or presence of nocodazole (10 nM) from 7 to 10 DIV. Neurons were treated with cold methanol (−20 °C) for 5 min before fixation with PFA 4 % and stained with antibodies against EB1 (red) and β -catenin-pS33/37/T41 (green). A DIC image of nocodazole-treated neurons was obtained to identify the position of the soma. **d** Acetylated- α -tubulin and β -catenin-pS33/37/T41 staining of control or 100 nM TSA-treated 15-DIV neurons extracted with 0.5 % Triton X-100. Note that β -catenin-pS33/37/T41 and acetylated- α -tubulin co-localize at the AIS in control neurons, while β -catenin-pS33/37/T41 is no longer restricted to the AIS and is located along the axon following acetylated- α -tubulin pattern, as previously shown [10]. Arrows indicate soma position. Scale bar 100 μ m in **a**, **b** and **d**, 20 μ m in **c**

Inhibition of GSK3 reduces ankyrinG tethering at the AIS and modifies electrophysiological properties

Next, we hypothesized that β -catenin-pS33/37/T41 may have a role in functional maturation after initial formation of the AIS. As β -catenin is phosphorylated at positions 33, 37, and 41 by GSK3, we first analyzed the localization of GSK3 in neurons. While GSK3 α/β staining was ubiquitous along the neuron, when neurons were submitted to detergent extraction, interestingly, GSK3 α/β staining was detected at the AIS (Fig. 5a). Next, we checked by Western-blot analysis that GSK3 inhibition was able to reduce β -catenin-pS33/37/T41 levels. Short-term GSK3 inhibition, with the previously used GSK3 inhibitor [44], did reduce by 60 % the amount of β -catenin-pS33/37/T41, at the same time that β -catenin levels were increased (Fig. 5b) as expected when GSK3 is inhibited for short times.

In view of these results, we analyzed whether long-term inhibition of GSK3 may modulate AIS protein tethering. Thus, we treated neurons with two other known inhibitors of GSK3, lithium (2.5 or 5 mM) or AR-A014418 (20 μ M), a selective GSK3 inhibitor tested against 52 other kinases [45]. Lithium treatment of high-density cultures of cortical neurons, for 24 or 48 h, revealed a 45–65 % reduction in β -catenin phosphorylation (Fig. 6e). Thus, given that β -catenin-pS33/37/T41 enrichment at the AIS starts after 3 DIV (Fig. 1), we treated hippocampal neurons with 2.5 mM LiCl from 4 DIV to 7 DIV (Fig. 6a, b, d). While control neurons show β -catenin-pS33/37/T41 staining at the AIS

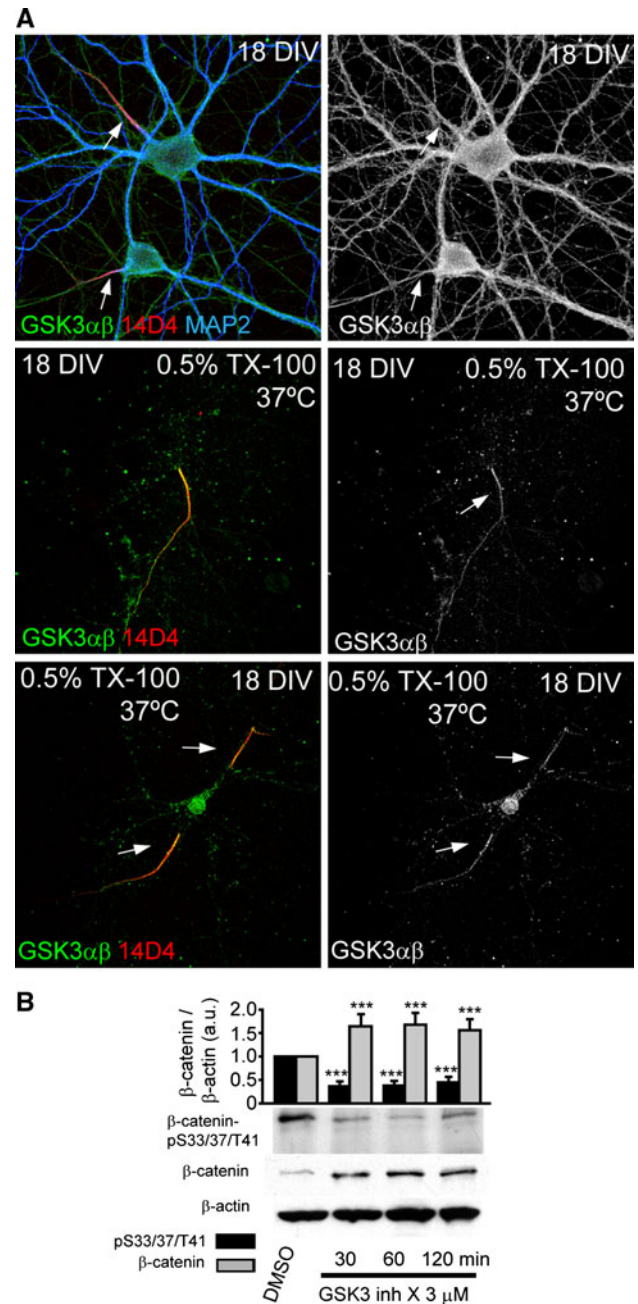


Fig. 5 β -catenin kinase, GSK3, is tethered to the AIS after detergent extraction. **a** GSK3 α/β staining at the AIS of 18-DIV hippocampal neurons after detergent extraction treatment with 0.5 % Triton X-100 for 10 min (bottom panels). Upper panels show ubiquitous GSK3 α/β staining in non-extracted neurons. Extracted and non-extracted neurons were stained with GSK3 α/β (green), 14D4 (red) and MAP2 antibodies (blue). Arrows indicate the AIS position. **b** Western-blot analysis showing β -catenin and β -catenin-pS33/37/T41 total expression in 2-DIV high-density cortical neurons cultures treated with 3 μ M GSK3 inhibitor X for 30, 60, and 120 min. Graph represents the mean and SEM of protein expression levels normalized to β -actin in three different experiments. ***p < 0.001, t test

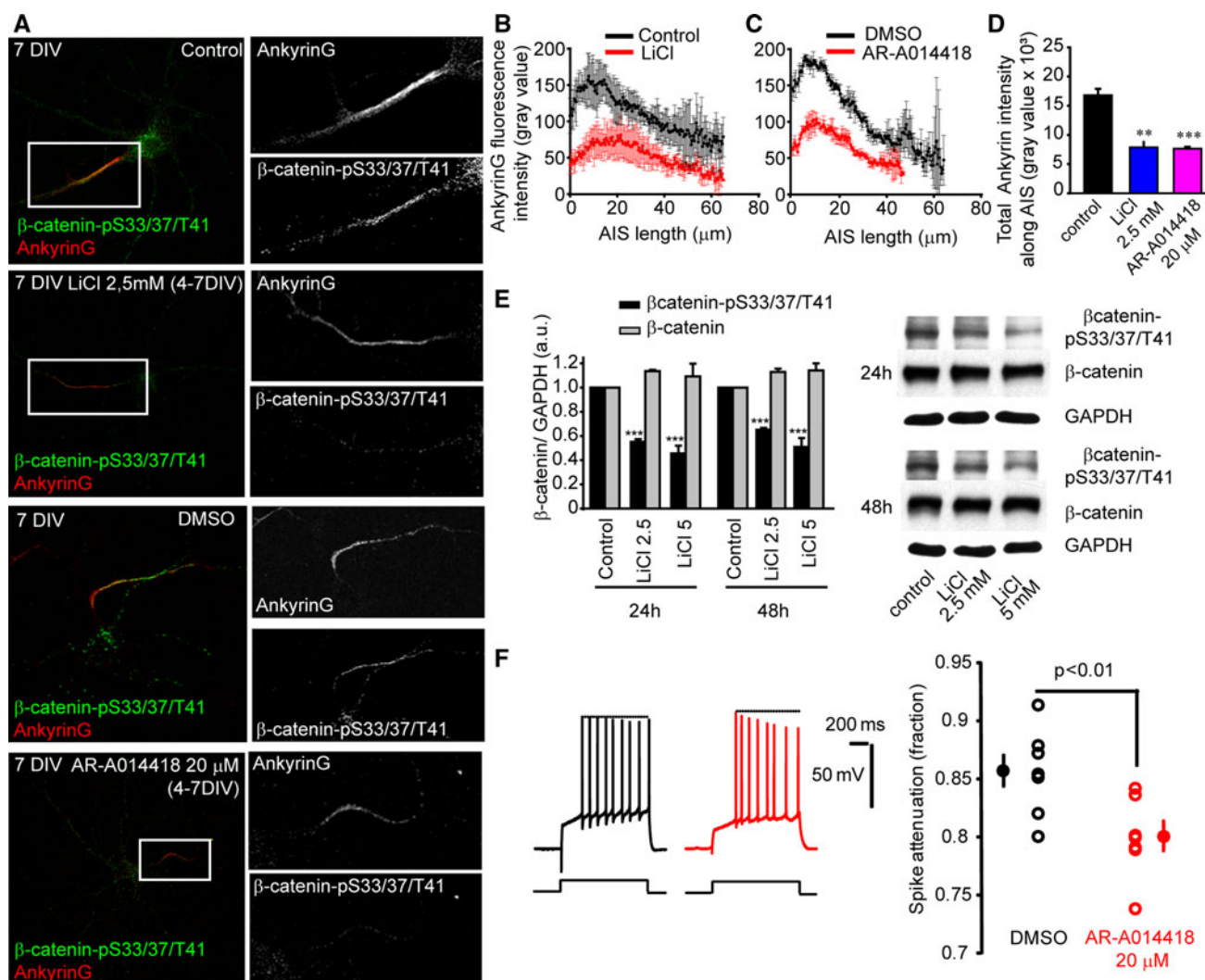


Fig. 6 GSK3 inhibition and β -catenin-pS33/37/T41 reduction diminishes ankyrinG clustering at the AIS and modifies action potential characteristics. **a** 7-DIV hippocampal neurons treated with 2.5 mM LiCl or 20 μ M AR-A014418 (GSK3 inhibitor) from 4 DIV to 7 DIV and stained for β -catenin-pS33/37/T41 (green) and ankyrinG (red). Boxes indicate the amplified AIS region shown on the right panels (gray scale). **b**, **c** Mean \pm SEM fluorescence intensity of ankyrinG along the AIS in control, LiCl, or AR-A014418-treated neurons as shown in **a**. Fluorescence intensity was measured along the AIS every 0.44 μ m of 60 neurons from three independent experiments (20 neurons/experimental condition and experiment) using the ImageJ software. **d** Total ankyrinG fluorescence intensity at the AIS

of neurons analyzed in **b** and **c**. Graph represents the mean \pm SEM. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$, *t* test. Scale bar 50 μ m. **e** β -catenin and β -catenin-pS33/37/T41 expression in control or 2.5 and 5 mM LiCl-treated neurons for 24 and 48 h. Graph represents the mean and SEM of protein expression levels normalized to GAPDH levels in three different experiments. $***p < 0.001$, *t* test. **f** Reduced amplitude of the last spike in cultured slices neurons “in vivo” treated with AR-A014418 20 μ M. Left, representative traces for control (DMSO, black) and treated neuron (AR-A014418, red). Note the reduction in the amplitude of the last spike. Right, plot of the spike attenuation (i.e., last spike/first spike) in control (DMSO, black) and treated (AR-A014418, red) neurons. Unpaired *t* test

co-localized with ankyrinG, β -catenin-pS33/37/T41 and ankyrinG staining was absent or highly reduced (2.5 fold) at the AIS of LiCl-treated neurons. The same results were obtained from neurons treated with AR-A014418 (20 μ M) compared to DMSO (0.1 %)-treated control neurons (Fig. 6a, c, d).

Subsequently, we examined the functional consequences of GSK3 inhibition and diminished β -catenin phosphorylation on the electrical properties of hippocampal neurons. Cultured slices were treated for 7 days with the GSK-3 inhibitor AR-A014418 or vehicle

(DMSO) and excitability was compared between the two groups. A significant decrease in the last spike amplitude was observed in AR-A014418 treated neurons (ratio of the last to the first spike: 0.80 ± 0.01 vs. 0.86 ± 0.01 in DMSO-treated neurons, $n = 7$, unpaired *t* test $p < 0.01$, Fig. 6f). This larger spike attenuation was further confirmed (0.85 ± 0.01 vs. 0.90 ± 0.02 , $p < 0.05$) when the recordings were performed in the presence of M-type potassium and calcium channel blockers (10 μ M XE991 and 50 μ M cadmium).

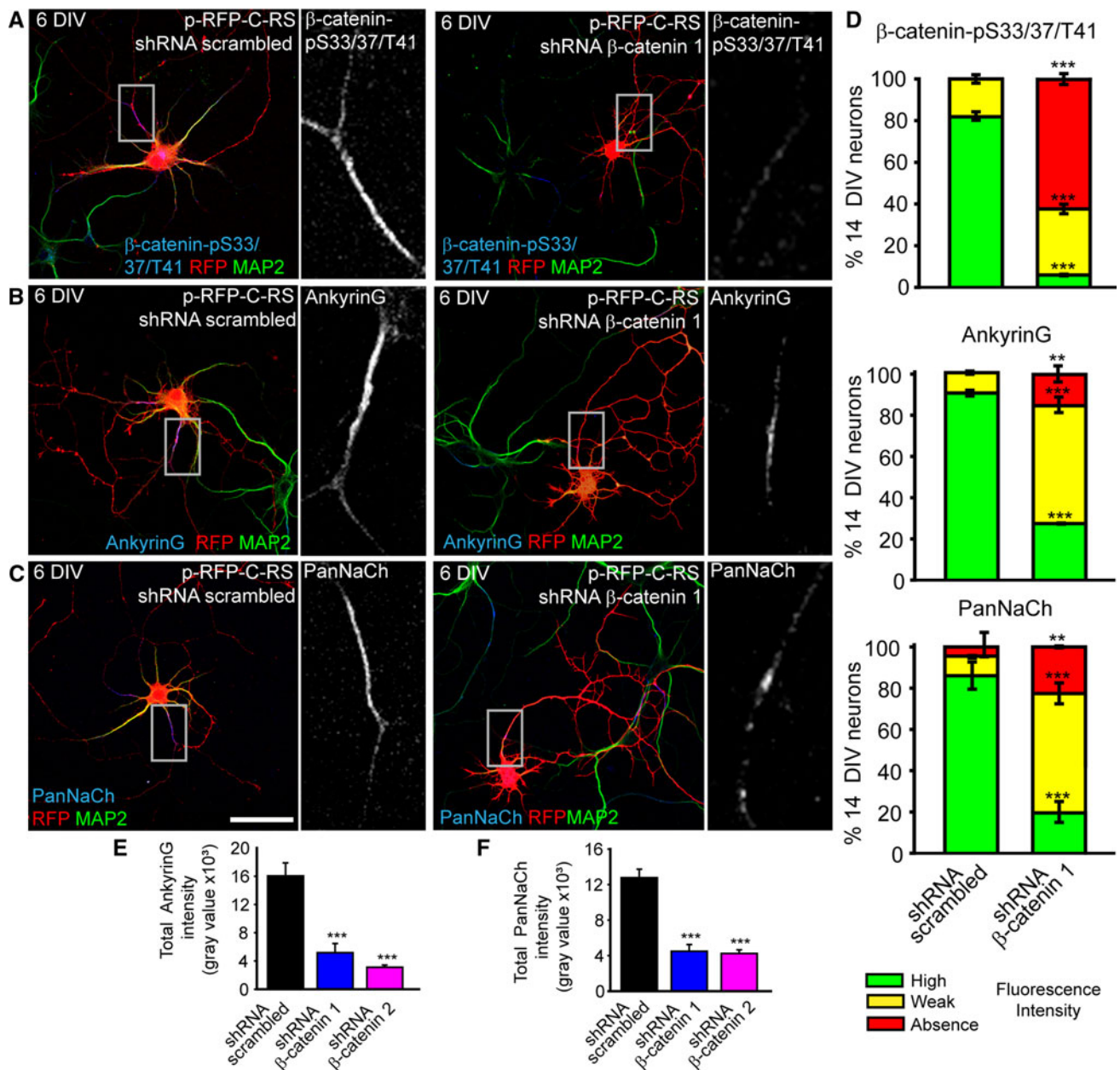


Fig. 7 Suppression of β -catenin-pS33/37/T41 expression by β -catenin interference shRNAs reduces ankyrinG, voltage-gated sodium channels clustering at the AIS. **a–c** 6-DIV hippocampal neurons nucleofected with RFP plasmids expressing scrambled shRNA or β -catenin shRNA. Neurons were stained with antibodies against β -catenin-pS33/37/T41 (**a**), ankyrinG (**b**), and PanNaCh (**c**). Neuronal somatodendritic compartment was identified by MAP2 antibody staining. *Insets* show enlarged views of the indicated axon initial segment (gray scale). **d** *Graphs* show the percentage of 14-DIV neurons showing high intensity (green), weak intensity (yellow) or absence (red) of β -catenin-pS33/37/T41, ankyrinG, or sodium

channels expression at the AIS of neurons expressing scrambled shRNA or β -catenin shRNA1. Neurons were considered in the weak intensity category when total staining intensity was 50 % or lower than that of control neurons mean. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments (100 neurons/experimental condition in each experiment). *** $p < 0.001$ and ** $p < 0.01$ compared to scrambled shRNA, t test. **e, f** *Bar graphs* represent the total fluorescence intensity of ankyrinG and PanNaCh staining measured every 0.4 μ m along the AIS in 50 neurons/experiment of those quantified in **d**. *** $p < 0.001$, t test. All images were acquired using the same fluorescence parameters. Scale bar 50 μ m

Suppression of β -catenin reduces AIS protein tethering and neuronal excitability

To fully understand the role of β -catenin-pS33/37/T41 in AIS maturation, we carried out a second experimental

strategy using two shRNAs against β -catenin. After nucleofection, hippocampal neurons were maintained in culture until 6 DIV or 14 DIV (i.e., when the AIS is fully formed). Both β -catenin shRNAs increased the percentage of neurons in which β -catenin-pS33/37/T41 staining was

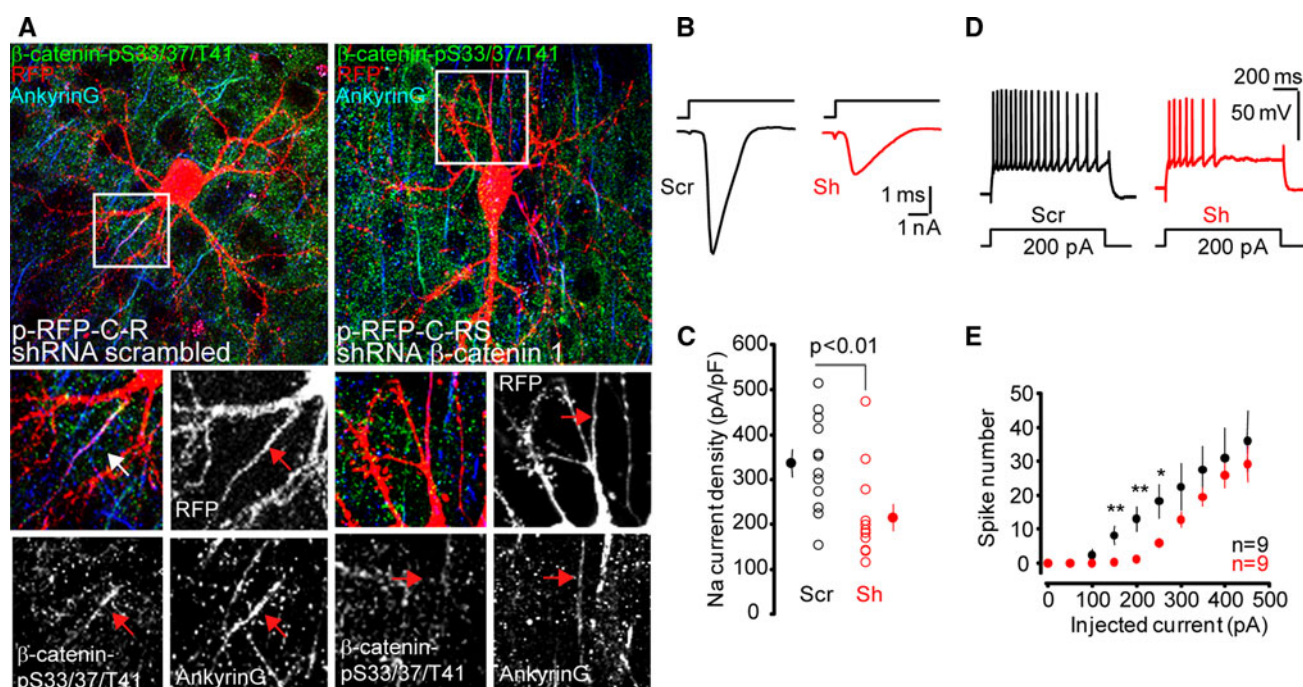


Fig. 8 β -catenin interference diminishes ankyrinG and β -catenin-pS33/37/T41 expression at the AIS, voltage-gated sodium channel current and action potential firing in brain slices. **a** Representative cortical neurons in mice brain slices expressing RFP and scrambled or β -catenin shRNAs. Brain slices were obtained from P8 mice, cultured for 2 days prior to plasmids delivery to neurons by GeneGun. Plasmid expression was allowed for 7 days before electrophysiological recordings and fixation. Slices were stained with antibodies against β -catenin-pS33/37/T41 (green) and ankyrinG (blue). *Insets* show a magnification of the AIS region. *Arrows* indicate AIS position. Note that in neurons expressing β -catenin interference shRNA, β -catenin-

absent or reduced (Fig. 7a, d and supplementary Fig. 7). Both β -catenin shRNAs slightly reduced axonal length at 3 DIV without affecting the further axonal elongation, and affected more significantly dendrites development (Supplementary Fig. 8) as previously shown [29]. Fluorescence intensity was measured along the AIS and staining was considered reduced or weak when total fluorescence intensity was 50 % or less than the mean fluorescence measured at control neurons (Fig. 7e, f). β -catenin shRNA1 was more efficient than shRNA2, in agreement with the results shown in supplementary Fig. 1, and their effects increased from 6 DIV to 14 DIV (Supplementary Fig. 7). In 14-DIV neurons, β -catenin-pS33/37/T41 was highly expressed at the AIS in 82 ± 1 % of scrambled shRNA nucleofected neurons and only 18 ± 2 % of neurons showed weak fluorescence intensity (Fig. 7d). In contrast, only 6 ± 1 % of β -catenin shRNA 1 had high-intensity β -catenin-pS33/37/T41 labeling at the AIS (Fig. 7d). In view of our results, we examined the tethering of other proteins (ankyrinG and voltage-gated sodium channel) at the AIS in neurons nucleofected with β -catenin shRNAs (Fig. 7 and Supplementary Fig. 7). Only

pS33/37/T41 immunoreactivity is absent at the AIS and ankyrinG intensity is reduced compared to scrambled neurons. *Scale bar* 50 μ m. **b** Sodium currents measured in L5 pyramidal neurons expressing the β -catenin shRNA 1 plasmid (Sh) or the scrambled shRNA (Scr) were evoked by a depolarizing step from -80 to -20 mV. **c** Plot of the sodium current density for test (Sh) and control (Scr) neurons. Note the significant reduction in the current density (unpaired *t* test). **d** Representative firing profiles for Scr and Sh neurons. **e** Input-output curves for Scr and Sh neurons. Note the significant reduction in excitability for Sh neurons (unpaired *t* test, ** $p < 0.01$, * $p < 0.02$)

27 ± 1 % of neurons nucleofected with β -catenin shRNA 1 exhibited strong tethering of ankyrinG at AISs, compared to 91 ± 1 % of scrambled shRNA-nucleofected neurons (Fig. 7b, d). In these neurons, the average ankyrinG intensity along the AIS was reduced fourfold compared to control neurons (Fig. 7e). In agreement with the reduction in ankyrinG tethering, the expression of sodium channels at the AIS was diminished in 6-DIV and 14-DIV neurons nucleofected with β -catenin shRNAs, exhibiting the same pattern of three clearly different phenotypes (Fig. 7c, d, f, and supplementary Fig. 7).

Hence, we examined the functional consequences of the elimination of β -catenin-pS33/37/T41. Scrambled or β -catenin shRNA 1 plasmids were delivered using Gene-Gun into cultured brain slices obtained from post-natal day 8 mice and analyzed 9 days later. In this experimental condition, AIS is completely formed at post-natal day 8 before β -catenin suppression. Neurons expressing the scrambled shRNA showed β -catenin-pS33/37/T41 and ankyrinG expression at their AIS, while in neurons expressing the β -catenin shRNA 1 plasmid, β -catenin-pS33/37/T41 expression at the AIS was strongly reduced or

absent and ankyrinG staining was decreased (Fig. 8a). The functional effect of this reduced expression was analyzed using patch-clamp recording. Transfected neurons were identified by their RFP fluorescence. The amplitude of the sodium current evoked by a voltage command from a holding potential of -80 to -20 mV was significantly reduced in L5 pyramidal neurons expressing the β -catenin shRNA 1 plasmid (Fig. 8b). The density of sodium current was 336 ± 31 pA/pF ($n = 12$) in neurons expressing the scrambled shRNA and 215 ± 30 pA/pF ($n = 12$) in neurons expressing the β -catenin shRNA 1 plasmid (unpaired t test, $p < 0.01$; Fig. 8c). We next compared excitability in the two classes of neurons in current clamp by injecting current steps of increasing amplitude. Compared to control neurons (scrambled shRNA), neurons expressing the β -catenin shRNA were found to be less excitable (Fig. 8d). The number of spikes evoked by 150, 200, or 250 pA was significantly reduced in neurons expressing β -catenin shRNA (Fig. 8e).

Thus, the fact that GSK3 inhibition, which stabilizes β -catenin levels, and β -catenin levels reduction with interference RNAs, results in a reduction of AIS proteins tethering suggest that β -catenin-pS33/37/T41 has a role in the functional maturation and maintenance of the AIS. Further experiments will be necessary to understand the complex role of GSK3 and β -catenin at the AIS.

Discussion

The underlying cellular mechanisms that regulate ion channel expression and maintenance at the membrane of the AIS, and therefore action potential regulation and excitability, are only beginning to be studied. It is generally recognized that ankyrinG is an important protein for the organization and assembly of the AIS [6, 14, 46, 47] and its tethering at the AIS is necessary for the concentration of other AIS proteins. However, little is known about the mechanisms that modulate and maintain the expression of proteins at the AIS.

Our results show for the first time the localization of GSK3 at the AIS and its role in the functional maturation and maintenance of the AIS. Moreover, GSK3 phosphorylated β -catenin is also tethered at the AIS and depends on ankyrinG expression. Both pharmacological inhibition of its phosphorylation by GSK3 or reduction of β -catenin levels diminished ankyrinG tethering at the AIS and the functional expression of voltage-gated sodium channels. These data bring a new insight into AIS maturation and is particularly relevant to neurodevelopment given the importance of this neuronal compartment in action potential initiation and in the control of polarized axonal traffic. Moreover, our data may be related to schizophrenia, a

mental disease with a neurodevelopmental origin, as post-mortem schizophrenic patients' brains show reduced GSK3 levels [48], abnormal GSK3 activity, and also a reduction of ankyrinG tethering at the AIS [49].

β -catenin-pS33/37/T41 shows a progressive enrichment at the AIS during development, reflecting the establishment of barriers to membrane diffusion and cytoplasmic traffic. A higher percentage of neurons with β -catenin-pS33/37/T41 tethering at the AIS was attained after 7 DIV, when the AIS forms a fully assembled membrane diffusion barrier [50]. In fact, the membrane diffusion barrier is not yet functional at 4 DIV, when only a small percentage of neurons show β -catenin-pS33/37/T41 tethering at the AIS. Moreover, the cytoplasmic traffic barrier of the AIS starts to appear at 3 DIV and is complete at 5 DIV [13] when at least 70 % of neurons show β -catenin-pS33/37/T41 tethering at the AIS.

Our data suggest that β -catenin-pS33/37/T41 is not necessary for the initial development of the AIS, but its enrichment plays a role in the maturation of AIS functions, modulating neuronal excitability and voltage-gated sodium currents. Previous works have shown that GSK3 is involved in LTP and LTD regulation [51–53], and β -catenin participates in the regulation of neuronal activity [54]. Regarding a possible function of β -catenin-pS33/37/T41 in action potential generation, the inhibition of GSK3 or β -catenin suppression decreased excitability in neurons from cultured brain slices. Although no interaction between voltage-gated sodium channels and β -catenin has been described, our data show that the loss of β -catenin-pS33/37/T41 is related to neuronal excitability by reducing voltage-gated sodium currents. While not excluding parallel transcriptional effects and since the decreased neuronal excitability observed in our study occurs independently of β -catenin levels, our results suggest that this effect is mediated by β -catenin-pS33/37/T41 rather than β -catenin levels. Thus, sodium current reduction is most probably due to diminished ankyrinG tethering at the AIS and the loss of AIS integrity when β -catenin-pS33/37/T41 is absent. In fact, AIS integrity is also lost in ankyrinG knockout mice [3], and it has been proposed that AIS integrity could be a critical determinant of the threshold and waveform of action potentials [55]. An interaction between β -catenin and large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels has been reported [34]. In addition, GSK3 participates in the regulation of the KCNQ2 potassium channels [56]. However, neither pharmacological inhibition of KCNQ2 nor voltage-gated calcium channel block using cadmium change the spike attenuation induced by GSK3 inhibition.

In the last decade, many reports have focused on understanding how different phosphorylation sites on β -catenin can define its binding interactions and therefore

different sub-cellular fates [21, 57]. In this context, it is also necessary to take into account different conformational modifications, such C-terminal region folding, proposed to prevent β -catenin degradation [58]. Tyrosine phosphorylation of β -catenin disrupts its interaction with N-cadherin and leads to its mobilization from membranes [59] to the nucleus or neuronal cytoskeleton [60]. On the other hand, while N-terminally unphosphorylated β -catenin (S33/S37/T41), located in the nucleus, seems to better correlate with Wnt signaling functions [61, 62], N-terminally GSK3 phosphorylated (β -catenin-pS33/37/T41) and ubiquitinated β -catenin is thought to be targeted for degradation at the proteasome [63]. Our results describe a new GSK3-phosphorylated β -catenin pool localized at the AIS, which participates in the AIS functions and is not immediately targeted to the proteasome.

Given the ubiquitous expression of GSK3, the stability of this pool of β -catenin-pS33/37/T41 at the AIS may be the consequence of the absence of APC (Supplementary Fig. 4), a critical component for β -catenin destruction [64]. In fact, APC co-clusters with stabilized non-phosphorylated β -catenin at neurite tips [33]. On the other hand, β -catenin is resistant to proteasome degradation when phosphorylated by CK2 [65], which is expressed at the AIS and regulates some of its properties [9, 66]. Finally, unidentified chaperones at the AIS may serve to protect β -catenin-pS33/37/T41 from degradation.

It has been described that disruption of the AIS actin cytoskeleton generates a reduction in the rate-of-rise of axonal action potentials, estimated as being due to the loss of approximately one-third of the sodium channels from the AIS [1]. Indeed, sustained inhibition of GSK3 by LiCl or a GSK3 selective inhibitor during establishment of the diffusion barrier (4–7 DIV) causes the loss of β -catenin-pS33/37/T41 and ankyrinG concentration at the AIS and a significant decrease in spike amplitude. This is even more significant when β -catenin levels are reduced and sodium current amplitude and the number of action potentials are diminished. Thus, β -catenin-pS33/37/T41 plays an important role in the reinforcement of the AIS.

Other studies have suggested a potential function of β -catenin-pS33/37/T41 in microtubule anchoring and centrosome maturation in epithelial cells [26]. In this sense, we have found that β -catenin phosphorylated by GSK3 is colocalized with microtubules in neurites in stage 2 and 3 hippocampal neurons. In more mature neurons, the AIS β -catenin-pS33/37/T41 pool is resistant to detergent extraction and co-localizes with detergent-resistant acetylated- α -tubulin microtubules, like other AIS proteins [10]. Microtubules at the AIS have distinct properties from those in dendrites [12, 43] and are highly enriched in more stable acetylated and detyrosinated microtubules. Changes in post-translational modifications of tubulin, such as

acetylation, can disturb protein tethering at the AIS [9, 10], and such is the case for β -catenin-pS33/37/T41, which after tubulin hyper-acetylation was localized all along the axon together with acetylated- α -tubulin. This absence of β -catenin-pS33/37/T41 enrichment is consistent with the loss of ankyrinG and sodium channel concentration at the AIS after disruption of its cytoskeleton [10]. Furthermore, nocodazole-induced depolymerization abolished β -catenin-pS33/37/T41 clustering in the AIS in our experiments, and also that of another AIS-tethered protein, EB1 [42, 43], suggesting a possible relationship with AIS cytoskeleton or a regulating function of β -catenin-pS33/37/T41. In fact, β -catenin suppression in brain slices once the AIS is formed alters the pattern of action potential generation and ankyrinG tethering.

In summary, we have found a new pool of β -catenin-pS33/37/T41 and its kinase, GSK3, at the AIS that regulate AIS maturation and modulate neuronal excitability through regulation of ankyrinG tethering, which in turn is responsible for the anchoring of sodium channels. The present findings represent an advance for the understanding of the molecular mechanisms underlying neuronal action potential generation. They raise the hypothesis that β -catenin phosphorylation and GSK3 activity at the AIS may be involved in mental diseases related to neuronal development and excitability, such as epilepsy, schizophrenia, or bipolar disorder. In fact, reduced levels of β -catenin expression and altered GSK3 function have been detected in schizophrenia patients [67]. Further experiments will be necessary to completely understand how GSK3 and phosphorylated β -catenin participates in AIS function and development.

Acknowledgments The authors would like to acknowledge Hector Diez, Sylvain Rama, Alfonso Araque, and Michael Seagar for their advice and critical reading of the manuscript. This work was supported by grants SAF2009-12249-C02-02 and SAF2009-12249-C02-01 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), by the Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED, Spain), INSERM and Agence National de la Recherche (EXCION, EPISOM). Mónica Tapia is supported by a CSIC-JAE fellowship.

References

1. Kole MH et al (2008) Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci* 11:178–186
2. Kole MH, Letzkus JJ, Stuart GJ (2007) Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron* 55:633–647
3. Ango F et al (2004) Ankyrin-based subcellular gradient of neurofascin, an immunoglobulin family protein, directs GABAergic innervation at purkinje axon initial segment. *Cell* 119:257–272
4. Garrido JJ et al (2003) A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science* 300:2091–2094

5. Ogawa Y et al (2008) Postsynaptic density-93 clusters Kv1 channels at axon initial segments independently of Caspr2. *J Neurosci* 28:5731–5739
6. Zhou D et al (1998) AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J Cell Biol* 143:1295–1304
7. Nakada C et al (2003) Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat Cell Biol* 5:626–632
8. Palay SL, Sotelo C, Peters A, Orkand PM (1968) The axon hillock and the initial segment. *J Cell Biol* 38:193–201
9. Sanchez-Ponce D, Munoz A, Garrido JJ (2011) Casein kinase 2 and microtubules control axon initial segment formation. *Mol Cell Neurosci* 46:222–234
10. Tapia M, Wandosell F, Garrido JJ (2010) Impaired function of HDAC6 slows down axonal growth and interferes with axon initial segment development. *PLoS One* 5:e12908
11. Winckler B, Forscher P, Mellman I (1999) A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature* 397:698–701
12. Konishi Y, Setou M (2009) Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat Neurosci* 12:559–567
13. Song AH et al (2009) A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment. *Cell* 136:1148–1160
14. Hedstrom KL, Ogawa Y, Rasband MN (2008) AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *J Cell Biol* 183:635–640
15. Sobotzik JM et al (2009) AnkyrinG is required to maintain axo-dendritic polarity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:17564–17569
16. Ciani L, Salinas PC (2007) c-Jun N-terminal kinase (JNK) cooperates with Gsk3beta to regulate Dishevelled-mediated microtubule stability. *BMC Cell Biol* 8:27
17. Jope RS, Johnson GV (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends Biochem Sci* 29:95–102
18. Morfini G et al (2004) A novel CDK5-dependent pathway for regulating GSK3 activity and kinesin-driven motility in neurons. *EMBO J* 23:2235–2245
19. Zhou FQ, Zhou J, Dedhar S, Wu YH, Snider WD (2004) NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* 42:897–912
20. Tyagarajan SK et al (2011) Regulation of GABAergic synapse formation and plasticity by GSK3beta-dependent phosphorylation of gephyrin. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:379–384
21. Gottardi CJ, Gumbiner BM (2004) Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol* 167:339–349
22. Liu C et al (2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108:837–847
23. Hart M et al (1999) The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 9:207–210
24. Faux MC, Coates JL, Kershaw NJ, Layton MJ, Burgess AW (2010) Independent interactions of phosphorylated beta-catenin with E-cadherin at cell-cell contacts and APC at cell protrusions. *PLoS One* 5:e14127
25. Maher MT, Mo R, Flozak AS, Peled ON, Gottardi CJ (2010) Beta-catenin phosphorylated at serine 45 is spatially uncoupled from beta-catenin phosphorylated in the GSK3 domain: implications for signaling. *PLoS One* 5:e10184
26. Huang P, Senga T, Hamaguchi M (2007) A novel role of phospho-beta-catenin in microtubule regrowth at centrosome. *Oncogene* 26:4357–4371
27. Shaw RM et al (2007) Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *Cell* 128:547–560
28. Ligon LA, Karki S, Tokito M, Holzbaur EL (2001) Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nat Cell Biol* 3:913–917
29. Yu X, Malenka RC (2003) Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci* 6:1169–1177
30. Yu X, Malenka RC (2004) Multiple functions for the cadherin/catenin complex during neuronal development. *Neuropharmacology* 47:779–786
31. Haegel H et al (1995) Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* 121:3529–3537
32. Campos VE, Du M, Li Y (2004) Increased seizure susceptibility and cortical malformation in beta-catenin mutant mice. *Biochem Biophys Res Commun* 320:606–614
33. Votin V, Nelson WJ, Barth AI (2005) Neurite outgrowth involves adenomatous polyposis coli protein and beta-catenin. *J Cell Sci* 118:5699–5708
34. Lesage F, Hibino H, Hudspeth AJ (2004) Association of beta-catenin with the alpha-subunit of neuronal large-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:671–675
35. Kaech S, Banker G (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1:2406–2415
36. Debanne D et al (2008) Paired-recordings from synaptically coupled cortical and hippocampal neurons in acute and cultured brain slices. *Nat Protoc* 3:1559–1568
37. Chilov D et al (2011) Phosphorylated beta-catenin localizes to centrosomes of neuronal progenitors and is required for cell polarity and neurogenesis in developing midbrain. *Dev Biol* 357:259–268
38. Sanchez-Ponce D, Tapia M, Munoz A, Garrido JJ (2008) New role of IKK alpha/beta phosphorylated I kappa B alpha in axon outgrowth and axon initial segment development. *Mol Cell Neurosci* 37:832–844
39. Pan Z et al (2006) A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci* 26:2599–2613
40. Rasband MN (2010) The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci* 11:552–562
41. Winckler B, Mellman I (1999) Neuronal polarity: controlling the sorting and diffusion of membrane components. *Neuron* 23:637–640
42. Leterrier C et al (2011) End-binding proteins EB3 and EB1 link microtubules to ankyrin G in the axon initial segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(21):8826–8831
43. Nakata T, Hirokawa N (2003) Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *J Cell Biol* 162:1045–1055
44. Kim WY et al (2006) Essential roles for GSK-3s and GSK-3-primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron* 52:981–996
45. Bhat R et al (2003) Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J Biol Chem* 278:45937–45945
46. Hedstrom KL et al (2007) Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *J Cell Biol* 178:875–886
47. Jenkins SM, Bennett V (2001) Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *J Cell Biol* 155:739–746
48. Nadri C, Dean B, Scarr E, Agam G (2004) GSK-3 parameters in postmortem frontal cortex and hippocampus of schizophrenic patients. *Schizophr Res* 71:377–382
49. Cruz DA, Weaver CL, Lovallo EM, Melchitzky DS, Lewis DA (2009) Selective alterations in postsynaptic markers of chandelier cell inputs to cortical pyramidal neurons in subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34:2112–2124

50. Brachet A et al (2010) Ankyrin G restricts ion channel diffusion at the axonal initial segment before the establishment of the diffusion barrier. *J Cell Biol* 191:383–395
51. Peineau S et al (2009) A systematic investigation of the protein kinases involved in NMDA receptor-dependent LTD: evidence for a role of GSK-3 but not other serine/threonine kinases. *Mol Brain* 2:22
52. Peineau S et al (2007) LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3 β . *Neuron* 53:703–717
53. Zhu LQ et al (2007) Activation of glycogen synthase kinase-3 inhibits long-term potentiation with synapse-associated impairments. *J Neurosci* 27:12211–12220
54. Peng YR et al (2009) Coordinated changes in dendritic arborization and synaptic strength during neural circuit development. *Neuron* 61:71–84
55. Zonta B et al (2011) A critical role for neurofascin in regulating action potential initiation through maintenance of the axon initial segment. *Neuron* 69:945–956
56. Kapfhamer D et al (2010) Protein phosphatase 2a and glycogen synthase kinase 3 signaling modulate prepulse inhibition of the acoustic startle response by altering cortical M-Type potassium channel activity. *J Neurosci* 30:8830–8840
57. Daugherty RL, Gottardi CJ (2007) Phospho-regulation of beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* 22:303–309
58. Mo R et al (2009) The terminal region of beta-catenin promotes stability by shielding the Armadillo repeats from the axin-scaffold destruction complex. *J Biol Chem* 284:28222–28231
59. Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M (1999) Regulation of E-cadherin/catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 274:36734–36740
60. David MD et al (2008) Signalling by neurotrophins and hepatocyte growth factor regulates axon morphogenesis by differential beta-catenin phosphorylation. *J Cell Sci* 121:2718–2730
61. Staal FJ, Noort Mv M, Strous GJ, Clevers HC (2002) Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin. *EMBO Rep* 3:63–68
62. Hendriksen J et al (2008) Plasma membrane recruitment of dephosphorylated {beta}-catenin upon activation of the Wnt pathway. *J Cell Sci* 121:1793–1802
63. Winston JT et al (1999) The SCF β -TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaB α and beta-catenin and stimulates IkappaB α ubiquitination in vitro. *Genes Dev* 13:270–283
64. Su Y et al (2008) APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCF β -TrCP ubiquitin ligase. *Mol Cell* 32:652–661
65. Song DH et al (2003) CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of beta-catenin potentiates Wnt signaling. *J Biol Chem* 278:24018–24025
66. Brechet A et al (2008) Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G. *J Cell Biol* 183:1101–1114
67. Lovestone S, Killick R, Di Forti M, Murray R (2007) Schizophrenia as a GSK-3 dysregulation disorder. *Trends Neurosci* 30:142–149